Reinhard Jonas

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN ZUR FETTSÄUREBIOSYNTHESE BEI MENSCH UND RATTE UNTER AUSGEWOGENER UND FETTARMER DIÄT

Diss München
1984

Aus dem Klinisch-Chemischen Institut des
Städtischen Krankenhauses München-Harlaching
Vorstand: Prof. Dr. L. Weiss

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN ZUR FETTSÄUREBIOSYNTHESE BEI MENSCH UND RATTE UNTER AUSGEWOGENER UND FETTARMER DIÄT

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der Zahnheilkunde
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Reinhard Jonas
aus
München

1983

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter : Prof. Dr. L. Weiss
Mitberichterstatter : Prof. Dr. M. Knedel
Dekan : Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung : 19. 1. 1984

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	10
2.1.	Reagentien	10
2.2.	Geräte	11
2.3.	Bestimmungsmethoden	12
2.3.1.	Aktivitätsbestimmung der Fettsäuresyntase	12
2.3.2.	Aktivitätsbestimmung der ATP-Citratlyase (optischer Test)	13
2.3.3.	Proteinbestimmung	14
2.3.4.	Messung von Acetyl-Coenzym A (Isotopentest)	15
2.3.5.	Messung von Citrat (Isotopentest)	17
2.3.6.	Aktivitätsbestimmung der ATP-Citratlyase (Isotopentest)	18
2.4.	Tierversuche	20
2.4.1.	Versuchstiere	20
2.4.2.	Versuchstierdiäten	20
2.4.3.	Tierhaltung und Versuchsablauf	22
2.4.4.	Gewebeentnahme bei Ratten	24
2.4.5.	Aufschluß der Rattengewebe	24
2.5.	Diätversuch beim Menschen	26
2.5.1.	Ernährung im Diätversuch	26
2.5.2.	Fettgewebsbiopsie	27
2.5.3.	Gewebsaufschluß	28
2.6.	Berechnungen	28

Seite

3.	Ergebnisse	30
3.1.	Optische Tests	30
3.2.	Radioisotopentests	31
3.2.1.	Extraktionsmethode für markiertes Acet-Anilid	31
3.2.2.	Acetyl-Coenzym A Bestimmung	33
3.2.3.	Citrat Bestimmung	34
3.2.4.	Messung der ATP-Citratlyase im Isotopentest	35
3.3.	Optimierung des gemeinsamen Gewebeaufschlusses	37
3.4.	Stabilität von ATP-Citratlyase und Fettsäuresyntase aus Rattengeweben	39
3.4.1.	Einfrieren der Gewebe	39
3.4.2.	Einfrieren der Homogenate	39
3.4.3.	Inkubation von Lebergewebe bei 25°C	42
3.5.	Diätetische Beeinflussung lipogenetischer Enzyme in Rattengeweben	44
3.5.1.	Induktion von ATP-Citratlyase und Fettsäuresyntase durch Wiederauffütterung	44
3.5.2.	Beeinflussung der Enzymaktivitäten durch den Fettgehalt des Futters	47
3.6.	Beeinflussung lipogenetischer Enzyme im menschlichen Fettgewebe durch kohlenhydratreiche Formeldiät	58
4.	Diskussion	60

Seite

4.1. Methoden 60
4.2. Diätversuche 63

5. Zusammenfassung 70

6. Literaturverzeichnis 72

Verwendete Abkürzungen:

ADP, ATP	Adenosindiphosphat, Adenosintriphosphat
^{14}C	markierter Kohlenstoff
cpm	Counts per minute
CoA, CoA-SH	Coenzym A
^{o}C	Grad Celsius
DTE	Dithioerythrol
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
g, mg, kg	Gramm, Milligramm, Kilogramm
^{3}H	tritierter Wasserstoff
J, kJ	Joule, Kilojoule
l, µl, ml	Liter, Mikroliter, Milliliter
m, nm, cm	Meter, Nanometer, Zentimeter
M, µM, mM	Molar, Mikromolar, Millimolar
min	Minuten
MOPS	Morpholinopropylsulfonsäure
NAD/$NADH_2$	Nicotinamidadenindinucleotid/reduziert
NADP/$NADPH_2$	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat/red.
P_i	anorganisches Phosphat
S.E.M.	Standardabweichung des Mittelwertes
TCA	Trichloressigsäure
TRIS	Trihydroxymethlaminomethan
U, mU	Unit, Milliunit

1. Einleitung

Die Fettsäuren sind als Bestandteile von Triacylglycerin und Phospholipiden wichtige Brenn- und Baustoffe des Körpers. Sie entstammen zwei Quellen. Zum einen sind sie Hydrolyseprodukte der Nahrungsfette, zum zweiten synteti-siert sie der Organismus aus Produkten des Kohlenhydrat-stoffwechsels.

Der Europäer deckt seinen Kalorienbedarf bei ausgewogener Ernährung zu 40 % mit Fetten (13). Der Anteil von Fetten und Kohlenhydraten am Brennwert der Nahrung ist dabei annähernd gleich.

Triacylglycerin wird im Darm gespalten. Die aufgenommenen Bestandteile werden in den Mucosazellen zu Fetten resynthetisiert und in Form von Chylomikronen und very low density Lipoproteinen (VLDL) über die Lymphe ins Blut abgegeben. Transportform des endogenen Triacylglycerins sind vorwiegend die VLDL der Leber; freie Fettsäuren werden an Albumin gebunden transportiert. Sie sind Hydrolyseprodukte der hormonsensitiven Triacylglycerinlipase im Fettgewebe, der Triacylglycerinlipase aus der Leber und der Lipoproteinlipasen verschiedener Organe.

Der tierische Organismus kann Fettsäuren auch aus Substraten des Kohlenhydrat-Abbaus synthetisieren (61, 66). Einen Oberblick über diesen Stoffwechselweg im Cytosol und in den Mitochondrien gibt die Abb. 1.

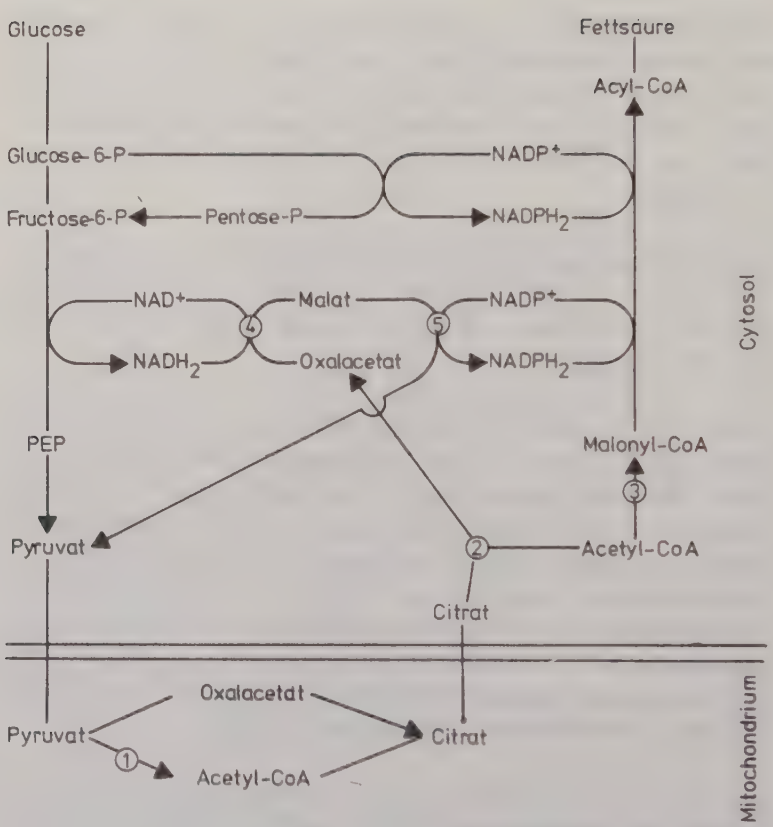

Abb. 1 Verknüpfung von Glykolyse und Fettsäure Biosynthese. Vereinfacht nach (40).

1 Pyruvatdehydrogenase
2 ATP-Citratlyase
3 Ac-CoA Carboxylase
4 Malatdehydrogenase
5 Malatenzym

Das Endprodukt der Glykolyse ist Pyruvat. Ober ein spezielles Transportsystem (22, 45) gelangt es in die Mitochondrienmatrix, dem Sitz der Pyruvatdehydrogenase (49, 50). Diese katalysiert Dehydrierung und Decarboxylierung zu Acetyl-CoA.

1) Pyruvat + CoA + NAD^+ ⟶ Ac-CoA + CO_2 + $NADH_2$

Für die aktivierte Essigsäure ist die Mitochondrienmembran undurchlässig (36), so daß andere Transportwege zum Ort der Fettsäuresynthese beschritten werden müßten. Diskutiert wurden der Umbau und Transport als Citrat, Acetat, Acetylcarnitin und Acetoacetat (25, 34).
In Rattengeweben wird ein Großteil von Acetyl-CoA über den Citratweg aus den Mitochondrien geschleust (35, 48, 59, 60, 61). Die Citratsyntase katalysiert die Reaktion von Acetyl-CoA und Oxalacetat zu Citrat; dieses gelangt mit Hilfe des Tricarboxylat-Transportsystems ins Cytosol. Dort wird Acetyl-CoA durch die ATP-Citratlyase Reaktion wiedergewonnen (55, 60, 61).

2) Citrat + ATP + CoA ⟶ ADP + Oxalacetat + Ac-CoA + P_i

Die Bedeutung dieses Weges in der Fettsäure Biosynthese belegen Versuche über den Citrateinbau in Fettsäuren (34, 59) und über die Regulation der ATP-Citratlyase im tierischen Organismus. Die Aktivität der ATP-Citratlyase reagiert auf Umstellung der Ernährungsbedingungen (34, 36), ist bei Alloxan-Diabetes erniedrigt (35), und wird durch Insulingabe wieder reaktiviert (35, 65).
Bei der Ratte entstammt zwar der größte Teil, aber nicht alles Acetyl-CoA dem Citratweg. Dies zeigt die bei spezifischer Hemmung der ATP-Citratlyase (42, 54, 76) noch ablaufende Fettsäuresynthese.

Acetyl-CoA dient einmal neben anderen Substraten als Primer in der Fettsäure Synthese, zum zweiten wird es von der biotinabhängigen Acetyl-CoA Carboxylase zu Malonyl-CoA carboxyliert.

3) $Ac\text{-}CoA + CO_2 + ATP \longrightarrow Malonyl\text{-}CoA + ADP + P_i$

Reduktionsäquivalente in Form von $NADPH_2$ stammen vorwiegend aus dem Pentosephosphatweg. Ein darüber hinausgehender Bedarf (36) wird durch die Reaktion des Malatenzyms gedeckt. Die Malatdehydrogenase katalysiert die Reduktion von Oxalacetat zu Malat.

4) $Oxalacetat + NADH_2 \longrightarrow Malat + NAD^+$

Aus diesem wird in der vom Malatenzym geförderten Reaktion durch dehydrierende Decarboxylierung Pyruvat.

5) $Malat + NADP^+ \longrightarrow Pyruvat + CO_2 + NADPH_2$

Als Summe beider Reaktionen wird Wasserstoff von $NADH_2$ auf $NADP^+$ übertragen.

Die eigentliche Fettsäure-Biosynthese katalysiert ein Multienzymkomplex, die Fettsäuresyntase. Alle Synthesezwischenstufen bleiben an einen beweglichen Substratcarrier gebunden. Die so erreichte Mikrokompartimentierung macht konkurrierende enzymatische Nebenreaktionen unmöglich (46).
Dieser Bindungsort, die "zentrale" SH-Gruppe ist die prosthetische Gruppe des Acylcarrierproteins. Das 4' Phosphopantethein wurde in verschiedenen Fettsäuresyntasen nachgewiesen (44, 46, 49).

die "periphäre" SH-Gruppe, der zweite Substrat Bindungsort, wurde als Cysteinrest im aktiven Zentrum des kondensierenden Teilenzyms charakterisiert.

Der grundsätzliche biochemische Ablauf der Fettsäure Biosynthese wurde von Lynen am Modell der Hefe-Fettsäuresyntase aufgeklärt (43), gilt aber auch in anderen Organismen (45, 74). Er beginnt mit der Acylierung der zentralen SH-Gruppe mittels der Acetyltransferase. Als Primer dienen Acetyl-Coa, Propionyl-CoA oder auch Buturyl-CoA (10, 33). Nach Obertragung des Acylrestes auf die periphere SH-Gruppe bindet Malonat an die zentrale SH-Gruppe. Die der Kondensation und Decarboxylierung der beiden Acylreste folgenden Reaktionen sind in Abb. 2 dargestellt. Mit Obertragung des um eine C_2-Einheit verlängerten Acylrestes auf die periphere SH-Gruppe, beginnt ein neuer Synthesezyklus.

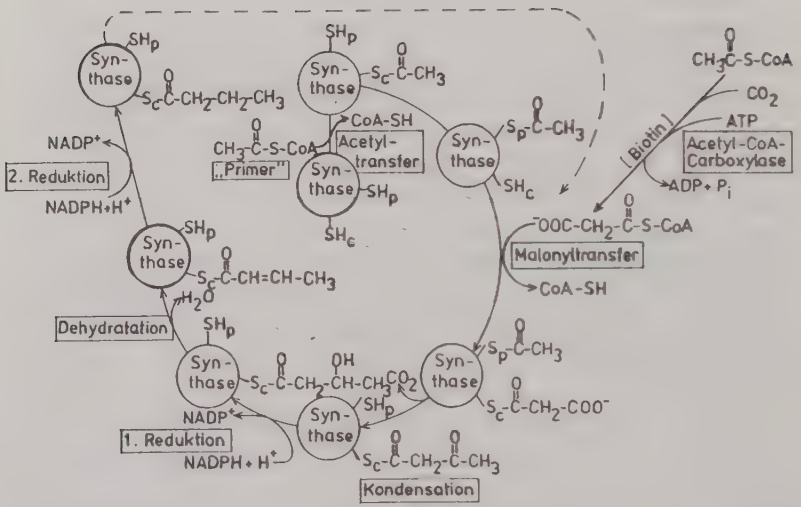

Abb. 2 Reaktionsablauf am Fettsäuresyntase Komplex. Nach (40).

Für die Fettsäuresyntase von Säugern wurde eine Struktur von zwei Untereinheiten nachgewiesen (58, 69). Für die Funktion der Synthese sind beide Untereinheiten notwendig. Die periphere SH-Gruppe der einen soll mit der zentralen SH-Gruppe der anderen zusammenwirken (68). Im dissoziierten Zustand fehlt der Fettsäuresyntase nur die Kondensationsreaktion.
Tierische Fettsäuresyntase produziert freie Fettsäuren (8), trotzdem benötigt sie zur Funktion CoA (39, 57).

Der energetisch aufwendige Weg der "de novo" Synthese von Fettsäuren unterliegt einer genauen Regulation. Metabolisch wirksam Hormone steuern die Enzymsynthese sowie deren Aktivierungsgrad. Für die Acetyl-CoA Carboxylase, das Schlüsselenzym der Fettsäure-Synthese wurde die Interkonvertierung nachgewiesen (37, 64). Zusätzlich sind positive und negative Effektoren im Spiel.
Die Pyruvatdehydrogenase ist in ihrem Phosphorylierungs- und damit Aktivierungsgrad vom Insulinspiegel abhängig (77).

Wege und Regulation der Neusynthese von Fettsäuren aus Kohlenhydraten wurden vorwiegend am Modell der jungen Ratte studiert. Messungen von Shrago (66) in menschlichen Fettgeweben ergaben deutliche Unterschiede im Einbau von Metaboliten des Kohlenhydratstoffwechsels in Fettsäuren und ließen Zweifel an der Obertragbarkeit der Aussagen von der Ratte auf den Menschen, aufkommen.
Die ATP-Citratlyase weist in menschlicher Leber und Fettgewebe nur 10 % bzw. 2 % der spezifischen Aktivitäten (30, 38, 66) in vergleichbaren Rattengeweben (26, 34) auf.
Körber und Fuchs bestimmten für die Fettsäuresyntase in menschlichen Geweben eine Aktivität von ca. 1 mU/mg Protein (17, 33). In der Rattenleber liegt sie bei 5, im Fettgewebe sogar bei 40 mU/mg (21).
Versuche, durch kurzfristige Diätumstellung lipogenetische Enzyme in menschlichen Leber und Fettgeweben zu induzieren (30, 33, 66) brachten im Gegensatz zu Rattenexperimenten (21, 34, 66) negative Ergebnisse.

Normalerweise erhalten Laborratten nur in geringem Maße Nahrungsfette und verfügen so über wenig externe Fettsäuren.
Wiederauffütterung mit einer Fettdiät induziert lipogenetische Enzyme von gehungerten Ratten weniger stark als eine kohlenhydratreiche Diät (33).
Versuche von Glas (21) haben gezeigt, daß in Leber und Fettgeweben von Ratten die spezifische Aktivität der ATP-Citratlyase vom Fettanteil des gegebenen Futters abhängt.

Relativ hohe Aktivitäten von menschlicher ATP-Citratlyase und Fettsäuresyntase (17, 30, 33) wurden auffallend häufig bei Patienten mit besonderen, fettarmen Ernährungsbedingungen (parenterale Ernährung, Alkoholismus) beobachtet.

Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, daß bestimmte Ernäh-

rungsgewohnheiten unterschiedliche Aktivitäten lipogenetischer Enzyme bedingen.

Mit vorliegender Arbeit sollte nun überprüft werden, ob die vom Abstillen an ausschließlich ausgewogen (Anteil am physiologischen Brennwert von Fetten und Kohlenhydraten = 40 %) ernährte Ratte dem Menschen stärker ähnelt, als das üblicherweise fettarm ernährte (Fettanteil unter 10 %), für Untersuchungen verwendete Labortier.
Hierzu wurden die Aktivitäten von ATP-Citratlyase und Fettsäuresyntase in Leber und Fettgeweben von ausgewogen ernährten Ratten verschiedenen Alters und verschiedenen Gewichts bestimmt.
Die Umstellung auf kohlenhydratreiche Diät sollte zeigen, daß sich die Enzymaktivitäten stimulieren lassen, wenn entsprechende Substrate angeboten werden. Als Kontrollen dienten während des ganzen Zeitraumes mit üblichem Labortierfutter (fettarm) ernährte Tiere.

Die Verwendung eines Radioisotopentests ermöglichte die Entwicklung einer rationellen Methode mit hoher Empfindlichkeit zur Messung der ATP-Citratlyase.

Im Rahmen eines Diätexperimentes an freiwilligen Versuchspersonen sollte die Induzierbarkeit von ATP-Citratlyase und Fettsäuresyntase im subcutanen Fettgewebe des Menschen durch fettarme Nahrung untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Reagentien

MERCK, Darmstadt: Citrat, Dioxan, EDTA, TRIS, para-Nitroanilin, Magnesiumchlorid, Trichloressigsäure, Biuretreagenz, Salzsäure, Natronlauge, Kalilauge, Chloroform, Methanol, Acetanilid, Anilin, Kaliumchlorid, Glyzerin 84 %.

SPEZIALFUTTERWERK LAGE, Lage: Altromin, Fertigfutter für Ratten und Mäuse.

BOEHRINGER, Mannheim: Coenzym A, ATP.

SIGMA, St. Luis, USA: Acetyl-CoA, Malonyl-CoA, $NADPH_2$.

SERVA, Heidelberg: MOPS, DTE, Farbstoff Blue G 250.

MERZ AND DADE, Miami, USA: Labtrol.

WACKER CHEMIE, Burghausen: Silikonöl AK 20, 0.95 g/ml.

HÖCHST, Frankfurt: Ultracain.

WANDER GmbH, Osthofen: Precitene, Meritene, Diättherapeutika als Fertigdiäten.

ROTH, Karlsruhe: Dioxan Szintigel.

N.E.N., Dreieichenhain: ^{3}H-Anilin, 1.5-^{14}C-Citrat.

^{3}H-Acetanilid:
50 ul ^{3}H-Anilin wurden mit 0.2 ml Acetanhydrid versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 30 min bei 40^{o} C wurde durch Zugabe von 1 ml H_2O das Acetanilid hydrolysiert. Aus der alkalischen Lösung wurde das Acetanilid drei mal mit 5 ml Chloroform extrahiert. Nach Abdampfen des Chloroforms wur-

de der Rückstand in Methanol aufgenommen.

Arylamin-Acetyltransferase:
Das Enzym wurde nach (3) 50-fach angereichert. Ausgangssubstanz war Taubenleber. Die Reinigung beinhaltet folgende Schritte: 30 000 g Oberstand, Protaminsulfatfällung, Ionenaustauschchromatographie auf DEAE-A 25 Sephadex, Gelfiltration auf Sephadex G 75.

ATP-Citratlyase:
Dieses Enzym wurde nach (27) in einem zwei Schritt Verfahren aus Rattenleber gereinigt: Ionenaustauschchromatographie auf DEAE A25 Sephadex, Affinitätschromatographie auf blauer Sepharose. Das zur Elution des Enzyms verwendete ATP wurde mittels Gelfiltration auf Sephadex G 25 quantitativ abgetrennt.

2.2. Geräte

Photometer 1101 M mit Küvettenwechselautomatik 2705 und Kompensationsschreiber 6512, Eppendorf
Tischzentrifugen 3200 und 5413, Eppendorf
Rotationsmischer 5432, Eppendorf
Thermostat 5320, Eppendorf
Reaktionsgefäße 3810 und 3812, Mikroliterpipetten, Eppendorf, Hamburg
pH-Meter, Modell 3500, Beckmann, USA
Analysenwaage, Mettler P 200
Mischer, Cenco Whirlmix
Heizplatten mit Thermostat, Janke & Kunkel
Flüssigkeitsszintilationszähler Mark II, Nuclear Chicago Division
Ultraturrax TP 18/10, Janke & Kunkel, Stauffen
Potter-Elvehjem Homogenisator, Braun, Melsungen.

2.3. Bestimmungsmethoden

2.3.1. Aktivitätsbestimmung der Fettsäuresyntase

Die von der Fettsäuresyntase katalysierten Reaktionsschritte lassen sich in folgender Summenformel zusammenfassen:

$$\text{Ac-CoA} + 7\ \text{Malonyl-CoA} + 14\ \text{NADPH}_2 \longrightarrow 7\ \text{H}_2\text{O} + \text{Palmitinsäure} + 8\ \text{CoA SH} + 7\ \text{CO}_2 + 14\ \text{NADP}^+$$

Die Kettenverlängerung um eine C_2 Einheit erfordert je Mol Fettsäure zwei Mole $NADPH_2$. (vgl. Einleitung)
Einer Fettsäuresyntase Aktivität von 1 mU entspricht der Umsatz von 1 nMol $NADPH_2$ pro min bei 25° C. In dem leicht modifizierten Test nach Martin, Horning, Vagelos (47) mit höheren Konzentrationen an Malonyl-CoA und Acetyl-CoA wurde bei 365 nm der Verbrauch von $NADPH_2$ in der 1 cm Küvette gemessen. Bei 25° C beträgt der Extinktionskoeffizient 3.5×10^6 cm^2/mol. Die Konzentrationen im Testvolumen von 250 µl waren:

0.4 M MOPS Puffer pH = 6.9
1.0 mM EDTA
5.0 mM DTE
200 µM $NADPH_2$
200 µM Acetyl-CoA
200 µM Malonyl-CoA

Gestartet wurde in der Küvette mit Malonyl-CoA. Durch entsprechende Verdünnung der Probe mit Puffer lag die Enzymaktivität im linearen Bereich des Testsystems. Der durch den unspezifischen Verbrauch von $NADPH_2$ bedingte Vorlauf wurde für die Berechnung abgezogen. Zur Kontrolle wurden Doppelwerte gemessen. Die Schreiberkurven waren vierfach gespreizt.

2.3.2. Aktivitätsbestimmung der ATP-Citratlyase

Die ATP-Citratlyase katalysiert die Spaltung von Citrat unter Bildung von Acetyl-CoA. Die Aktivität wurde nach (24) gemessen. Testreaktion:

1) Citrat + ATP + CoA-SH ⟶ Oxalacetat + Ac-CoA + ADP + P_i

2) Acetyl-CoA + pNA ⟶ pNAA + CoA-SH

1: ATP-Citratlyase 2: Arylamid-Acetyltransferase

Die Konzentrationsabnahme von para-Nitroanilin (pNA) wurde bei 405 nm und 25° C in einer 1 cm Küvette registriert. 1 mU ATP-Citratlyase im System bildet 1 nMol para-Nitroacetanilid (pNAA) pro min bei 25° C.
Der Extinktionskoeffizient beträgt hier 10 x 10^6 cm^2/Mol (24). Der Testansatz enthielt in 0.25 ml:

50 mM TRIS/HCl Puffer pH = 8.0
12 mM $MgCl_2$
0.15 mM para-Nitroanilin
3.0 mM DTE
6.0 mM ATP
80 µM CoA-SH
20 mM Citrat
10 mU Arylaminacetyltransferase (AAAT).

Das Homogenat wurde verdünnt eingesetzt, so daß die Enzymaktivität im linearen Bereich des Tests lag (siehe Abschnitt 3.1.). Die Reaktion wurde mit Citrat in der Meßküvette gestartet. Die Extinktionsänderung zeichnete ein Schreiber vierfach gespreizt auf. Von jeder Probe wurden Doppelwerte gemessen.

2.3.3. Proteinbestimmung

Zur Berechnung der spezifischen Enzymaktivitäten war der Proteingehalt der Proben notwendig. Die Homogenate der Rattengewebe ließen eine Bestimmung nach der von (24) modifizierten Biuret Methode zu.
Die störenden Lipide lösen sich in 1 ml Dioxan und wurden nach zwei-minütiger Zentrifugation bei 10 000 g abgesaugt. Der Niederschlag im Eppendorf Gefäß wurde durch Schütteln in 0.3 M TCA resuspendiert und so von wasserlöslichen Bestandteilen befreit. Der Oberstand - nach erneutem Zentrifugieren - wurde verworfen. Der verbleibende Proteinniederschlag wurde in 1 ml Biuret-Reagenz gelöst, und dann die Extinktion der Lösung bei 546 nm vermessen. Den Leerwert bildete reines Biuret Reagenz. Als Standard wurde das Kontrollserum Labtrol verwendet.

Homogenate von menschlichem Fettgewebe machten wegen des geringen Gehaltes an Protein eine Bestimmung nach der empfindlichen Bradford Methode erforderlich (5). Das Reagenz wurde mit dem Farbstoff Serva Blue G 250 hergestellt. Zwei bis zehn µg Protein in einem Volumen von 100 µl wurden mit 1 ml Reagenz versetzt, und nach 20 min die Extinktion bei 578 nm im Photometer gegen einen Leerwert abgelesen. Als Standard diente wieder Labtrol.

2.3.4. Messung von Acetyl-Coenzym A

Die von der Arylaminacetyltransferase katalysierte Reaktion:

Acetyl-CoA + Anilin ⟶ Acetanilid + CoA-SH

eignet sich als Indikatorsystem für die Acetyl-CoA Bestimmung im Radioisotopentest. Die Markierung kann sich dabei sowohl im Acetyl-CoA als auch im Anilin befinden. Das gebildete, markierte Acetanilid muß von den markierten Ausgangssubstanzen abgetrennt werden.
Für die Isotopentest in dieser Arbeit wurde ein auf 2 ml Gefäße umgestelltes, rationelles Trennverfahren verwendet. Es wird im folgenden beschrieben.
Nach dem Stoppen des Reaktionsansatzes im 2 ml Gefäß (siehe folgend Kapitel) wurde das markierte Acetanilid durch dreimaliges Ausschütteln in 1 ml Chloroform, dem 3.3 mM "kaltes" Acetanilid zugesetzt war, extrahiert. Hierzu wurden die Eppendorf-Gefäße in einen Zentrifugenständer gesteckt, und 10 min horizontal auf dem Rotationsmischer gerüttelt. Anschließend folgte zweiminütiges Zentrifugieren in der Tischzentrifuge. Die so abgetrennte, schwerere organische Chloroformphase enthielt das markierte, "heiße", und das "kalte" Acetetanilid. Diese wurde mittels einer 1 ml Pipette in ein Szintilationsgefäß aus Glas überführt. Dabei durften keinenfalls Reste der wässrigen Phase mit pipettiert werden. Bei 50° C wurde das Chloroform im warmen Luftstrom vorsichtig eingedampft, um kein Acetanilid zu verlieren (Föhnabstand 1 m, 1000 Watt Leistung). Auf der Heizplatte lag eine 1 cm starke Glasplatte, um einen gleichmäßigen Temperaturverlauf in den Glasszintillationsgefäßen zu erzielen.
Der das Acetanilid enthaltende Rückstand wurde in 1 ml Me-

thanol gelöst, und die Radioaktivität der Probe nach Zugabe von 10 ml Szintilationsgel (Dioxan) in einem entsprechenden Szintilationszähler bestimmt.
Im folgenden ist die Acetyl-CoA Bestimmung mit Hilfe von tritiummarkiertem Anilin beschrieben. In der oben angeführten Reaktion entsteht pro Mol Acetyl-CoA ein Mol tritiummarkiertes Acetanilid.
Wegen des nahezu vollständigen Ablaufes der Reaktion läßt sich diese bei hoher Konzentration an Arylaminacetyltransferase (AAAT) als Endpunktmethode verwenden.
Der Testansatz enthielt in 0.25 ml:

50 mM TRIS/HCl Puffer pH = 7.0
1 mM DTE
1 mM EDTA
80 µM CoA-SH
13 µM ^{3}H-Anilin
20 mU AAAT
0-10 µM Acetyl-CoA.

Nach dem Zusammenpipettieren in ein 2 ml Eppendorfgefäß wurde 30 min bei 25^{o} C im Thermoblock inkubiert. Durch Zugabe von 0.1 ml einer 100 mM Anilinlösung in 3 N HCl wurde der Reaktionsablauf gestoppt.
Im sauren Mileau lag die schwache Base Anilin als Ion vor, die polare Form verblieb in der wässrigen Phase. Das Abtrennen des gebildeten markierten Acetanilids erfolgte wie oben beschrieben.
Tritiiertes Anilin wurde als Standard direkt ins Szintigel eingebracht und so vermessen. Der Leerwert, eine Probe ohne Acetyl-CoA, wurde von den Meßwerten abgezogen. Die Konzentration von Acetyl-CoA im Test konnte somit nach folgender Gleichung berechnet werden:

$$\text{Acetyl-CoA } (\mu M) = \frac{\text{cpm Probe - cpm Leerwert}}{\text{cpm Anilinstandard}} \times \text{Anilin } (\mu M)$$

2.3.5. Messung von Citrat (Isotopentest)

In einem zusammengesetzten Substrattest konnte Citrat gemessen werden. Die Reaktionsschemata von ATP-Citratlyase und Acrylaminacetyltransferase sind oben unter 2.3.2. aufgeführt. Hier diente nun tritiiertes Anilin anstelle von p-Nitroanilin als Indikatorsubstanz. Die in hoher Konzentration eingesetzten Enzyme gewährleisteten einen quantitativen Ablauf der Endpunktbestimmung in einem vertretbaren Zeitraum.
0.25 ml Testansatz enthielten:

50 mM TRIS/HCl Puffer pH = 8.0
12 mM $MgCl_2$
40 mM KCl
3 mM DTE
6 mM ATP
80 µM CoA-SH
13 µM ^{3}H-Anilin
10 mU ATP-CL
20 mU Arylaminacetyltransferase
0-10 µM Citrat.

KCl erhöht bei niedrigen Citratkonzentrationen die Aktivität der ATP-Citratlyase (27). Die Reaktionsgefäße wurden bei 25^0 C im Thermoblock 10 min inkubiert. Stop der Reaktion und das weitere Aufarbeiten der Proben geschah wie unter 2.3.4. beschrieben. Den Leerwert ergab eine citratfreie Probe.

2.3.6. Aktivitätsbestimmung der ATP-Citratlyase (Isotopentest)

Als Indikatorsubstanz diente in diesem Test 1.5-^{14}C-Citrat. Die ATP-Citratlyase spaltet 1-^{14}C-Acetyl-CoA ab, welches dann auf Anilin übertragen wird (Reaktionsschema wie oben, optischer Test). Ein Mol gebildetes ^{14}C-Acetanilid hat nur halb soviel Aktivität wie ein Mol eingesetztes "heißes" Citrat. Die andre Hälfte enthält das 4-^{14}C-Oxalacetat.

In 0.25 ml Testansatz lagen vor:

50 mM TRIS/HCl Puffer pH = 8.0
12 mM $MgCl_2$
40 mM KCl
3 mM DTE
0.4 mM Anilin
6 mM ATP
80 µM CoA-SH
2 mM 1.5-^{14}C-Citrat
20 mU Arylaminacetyltransferase
50 µl Testhomogenat (ATP-CL).

Das Reaktionsgemisch in 2 ml Eppendorf Gefäßen stand 5 min bei 25° C zum Temperaturausgleich im Thermoblock, bevor mit Citratlösung gestartet wurde.

Nach 40 min Inkubation wurde mit 100 µl 1 M Citrat in 3 N NaOH gestoppt. Citrat und Oxalacetat lagen so in der basischen, wässrigen Phase als Salze vor, und wurden nicht meßbar in die organische Phase überführt. Das markierte Acetanilid wurde wie oben beschrieben abgetrennt.

1 nMol eingesetztes Citrat hatte eine Aktivität von ca. 1000 cpm, so daß 1 mU ATP-Citratlyase im Test 1 nMol heißes Acetanilid, entsprechend 500 cpm pro min produzier-

te. Die Aktivitäten der Proben errechneten sich entsprechend.
Die Aktivität von Leerwerten (Wasser statt Homogenat) wurde entsprechend berücksichtigt.

2.4. Tierversuche

2.4.1. Versuchstiere

Alle Tierversuche wurden mit männlichen Albinoratten des Typs Sprague Dawley von der Firma Ivanova Kisslegg/Allgäu durchgeführt. Vor Beginn des jeweiligen Experimentes konnten sich die Tiere eine Woche an die veränderten Umgebungsbedingungen gewöhnen.
Für die Untersuchungen an neugeborenen Ratten wurden trächtige weibliche Tiere kurz vor dem Wurf geliefert. Ansonsten kamen die Tiere mit einem Gewicht von ca. 160 g vom Züchter.

2.4.2. Versuchstierdiäten

In der Regel erhielten die Ratten Altromin, ein pelletiertes Fertigfutter. Im folgenden wird dies als Diät III geführt.
Bei Wiederauffütterung nach dem Hungern wurde den Ratten zusätzlich Zwieback angeboten.
Das genau definierte Futter für den Diätversuch 3.5.2. wurde eigens gemischt. Bei der Diät I entfiel der größte Anteil am Brennwert auf Kohlenhydrate, an Fetten enthielt sie nur Sojaöl. Diät II gleicht in der groben Zusammensetzung der Ernährung eines Durchschnitteuropäers. Fette und Kohlenhydrate sind in kalorisch ausgewogenen Teilen enthalten.
Diät I und II wurden den Ratten als Pulver verfüttert.

Die Zusammensetzung, sowie der physiologische Brennwert ist den Tab. 1 und Tab. 2 zu entnehmen. Der Brennwertberechnung liegen als spezifische Daten zugrunde: Kohlenhydrate 17.2 kJ/g, Fette 38.9 kJ/g und Proteine 17.2 kJ/g.

Tab. 1 Rattenfutter
Komponenten und spezifischer physiologischer Brennwert der verwendeten Futtermittel.
Diät I: kohlenhydratreiches Futter
Diät II: ausgewogenes Futter
Diät III: Altromin Fertigfutter.

Bestandteile		Diät I	Diät II	Diät III
Proteine	kJ/100 kJ	13.8	13.8	23.9
Kohlenhydrate	kJ/100 kJ	81.5	43.2	68.5
Fette	kJ/100 kJ	4.7	43.0	7.6
spezifischer Brennwert	kJ/g	16.3	16.3	15.8

Tab. 2 Rattenfutter
Mischung und physiologischer Brennwert der Bestandteile in Diät I und Diät II. Lupulen (Polyäthylenpulver) wurde der Diät II beigemengt, um den gleichen spezifischen Brennwert wie bei Diät I zu erreichen.

	Masseanteil g/100 g		Energieanteil J/100 J	
	Diät I	Diät II	Diät I	Diät II
Casein	13.0	13.0	13.6	13.6
Maisstärke	77.9	40.9	81.5	43.2
Sojaöl	2.0	2.0	4.7	4.7
Rindertalg	-	10.7	-	25.6
Schweineschmalz	-	5.3	-	12.7
Mineralsalze	5.0	5.0	-	-
Vitamine	2.0	2.0	-	-
a-Methionin	0.1	0.1	0.2	0.2
Lupulen	-	21.0	-	-
Summe	100.0	100.0	100.0	100.0

2.4.3. Tierhaltung und Versuchsablauf

Futter und Wasser stand den Ratten ad libitum zur Verfügung, auf besondere Fütterungsrhythmen wurde verzichtet. Eine Ausnahme bildete der Wiederfütterungsversuch 3.5.1.

Jeweils drei bis vier Tiere wurden in einem Käfig gehalten. So konnten Verbrauch und Wachstum besser verfolgt werden. Entsprechende Wägungen erfolgten zweimal pro Woche.

Für Versuch 3.5.1. wurden achtzehn Ratten verwendet, als Futter erhielten sie Diät III. Startgewicht waren ca. 180 g. Sechs Tiere bildeten den Ausgangswert, sechs weitere erhielten für 48 Stunden kein Futter. Die restlichen sechs wurden vor dem Schlachten weitere 48 Stunden wiederaufgefüttert (Zwieback + Altromin).

Insgesamt 76 Ratten standen für den Versuch zur Diätabhängigkeit des Fettstoffwechsels (3.5.3.) zur Verfügung. Sechs davon wurden am Morgen nach der Geburt getötet (Gewicht ca. 6 g). 15 Tage waren die Rattenbabies auf die Milch der Mutter angewiesen. Dann, mit einem Gewicht von ca. 40 g waren die kleinen Ratten abgestillt und in der Lage, sich vom angebotenen Futter zu ernähren. Fünf Tiere wurden nach dem Abstillen verwendet.
Die verbliebenen 65 Ratten wurden auf die Käfige verteilt, und 23 mit der kohlenhydratreichen Diät I, 42 mit der ausgewogenen Diät II gefüttert.
Um die Enzymmessungen auf das Tiergewicht beziehen zu können, wurden für die Punkte bei 100 g und 200 g Ratten von ungefähr gleichem Gewicht zu homogenen Gruppen zusammen gefaßt. 20 Tiere aus der Diätgruppe II erhielten, nachdem sie ein Gewicht von 200 g erreicht hatten, ausschließlich

die kohlenhydratreiche Diät I, und bildeten so die "Diätwechslergruppe" mit Meßpunkten nach drei, sieben und vierzehn Tagen kohlenhydratreicher Ernährung.
Kontrolltiere aus Diätgruppe I und Diätgruppe II wurden nach Oberschreiten der 200 g Grenze mit ihrer ursprünglichen Diät weitergefüttert, und nach vierzehn Tagen geschlachtet.
Abb. 3 gibt eine Obersicht dieses Versuchsablaufes, und die Anzahl der für die jeweiligen Meßpunkte verwendeten Ratten.

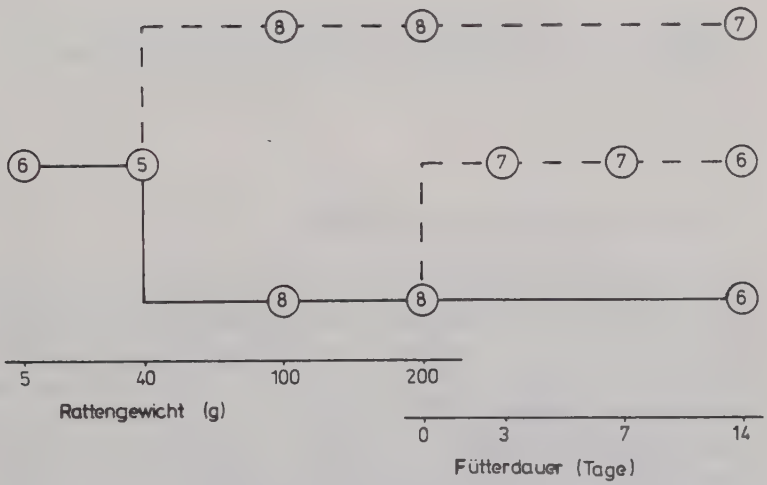

Abb. 3 Rattendiätversuch
Zeitlicher Plan des Ablaufes. Durchgezogene Linie: Futter Diät II, unterbrochene Linie: Futter Diät I. Die Ziffern geben die Anzahl der für einen Meßpunkt geschlachteten Ratten an.

2.4.4. Gewebeentnahme bei Ratten

Die Tiere wurden durch Genickschlag und Dekapitation getötet. Nach Laparatomie wurden Leber und epididymale Fettgewebe entnommen und das Frischgewicht bestimmt. Vom größten Leberlappen wurde ein Keil exzidiert, abgewogen und in eisgekühlten Aufschlußpuffer verbracht. Ebenso wurde mit möglichst gefäß- und bindegewebsfreien Fettstückchen vom mittleren Teil des epididymalen Fettgewebes, mit Fettgewebe aus der Psoasloge (Nierenlager) und der Leistenbeuge (subkutan) verfahren. Für je 0.2 g Gewebsprobe wurden 1 ml Aufschlußpuffer im Polystyrolröhrchen vorgelegt.

Gewebeproben für die Versuche zu Enzymhaltbarkeit wurden speziell weiter behandelt. Das Vorgehen ist im jeweils entsprechenden Abschnitt des Ergebnisteils beschrieben. (unter 3.4.)

2.4.5. Aufschluß der Rattengewebe

Für alle Bestimmungen, mit Ausnahme der Haltbarkeitsversuche, wurden die Gewebeproben unmittelbar nach der Entnahme mit dem Ultraturrax Homogenisator aufgeschlossen. Begründet war dies durch die Ergebnisse unter 3.4., der Versuche zur Enzymstabilität.
Das Polystyrolröhrchen wurde dabei in einer Eis/NaCl Lösung gekühlt. Durch Homogenisationsintervalle von 10 Sekunden wurde eine gleichmäßig trübe Suspension erzielt.
Der Aufschlußpuffer enthielt, mit Ausnahme des Versuchs zur Ermittlung des günstigsten Aufschlußmediums (3.3.), jeweils:

100 mM MOPS/NaOH pH = 7.5
3 mM DTE
1 mM EDTA.

Dies entspricht dem Puffer aus Versuch 3.3., der die günstigsten Ergebnisse erzielte.
Ein Aliquot des Homogenates wurde in gekühlte Eppendorf Gefäße überführt, die 0.1 ml Silikonöl enthielten. Nach zwei min Zentrifugation bei 4^{o} C und 10 000 g in der Tischzentrifuge, trennte sich die Suspension gemäß Abb. 4 auf. Das Silikonöl passender Dichte (0.95 g/ml) bildet die Grenzschicht zwischen Lipiden und wässrigem, enzymhaltigen Gewebsextrakt (77). Dieser wurde mit einer gekühlten Kanüle/Einmalspritze nach Durchstechen der Lipidschicht sorgfältig abgesaugt und in ein weiteres Eppendorf-Gefäß überführt. Die Enzymmessungen erfolgten umgehend.

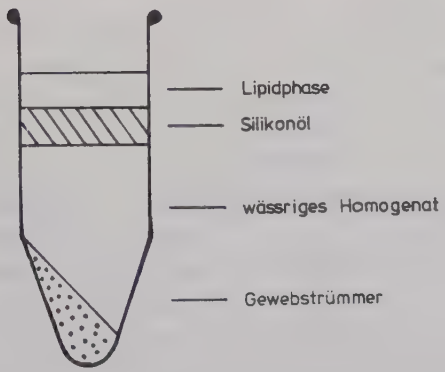

Abb. 4 Gewebeaufschluß mit der Silikonöltechnik. Schichtung im Zentrifugenröhrchen.

2.5. Menschlicher Diätversuch

2.5.1. Ernährung im Diätversuch

Vier freiwillige Versuchspersonen stellten für diese Untersuchung für drei bis sechs Wochen ihre Eßgewohnheiten um. Grundlage der Ernährung im Diätversuch waren bilanzierte, vollresorbierbare Formeldiäten der Firma Wander, Meritene^{R} und Precitene^{R}. Sie zeichnen sich durch relativ niedrigen Fettgehalt aus und stehen in verschiedenen Geschmacksrichtungen zur Verfügung.
Weiterhin sind sie leicht zuzubereiten. Sie machten den Großteil der Energiezufuhr aus. Ober die Bestandteile und deren Anteil am physiologischen Brennwert gibt die Tab. 3 Auskunft.
Folgende fettfreie Nahrungsmittel mit niedrigem kalorischem Gehalt durften in begrenztem Maß zusätzlich verzehrt werden:

Tab. 3 Diätversuch beim Menschen
Komponenten und spezifische Brennwerte der Formeldiäten

Bestandteile	Masseanteil g/100 g		Energieanteil g/100 g	
	Meritene	Precitene	Meritene	Precitene
Kohlenhydrate	51.2	78.2	55.4	80.8
Proteine	32.8	10.4	35.5	10.8
Fette	3.7	3.8	9.1	8.4
Obrige	12.3	7.8	-	-
spezifischer Brennwert kJ/g			15.9	16.6

Obst: Äpfel, Orangen, Aprikosen
Gemüse: Gurken, Tomaten, Rettich und ähnliches
Getränke: Tee, Kaffee (ohne Milch, wenig Zucker), Mineralwasser
Sonstiges: Gewürze und Kochsalz.

Die Mahlzeiten wurden auf mindestens vier Portionen pro Tag verteilt. Um seinen Energiebedarf zu decken, nahm ein Proband pro Tag ca. 600 g Formeldiät zu sich.
Da im ersten Diätversuch bei freier Ernährung mit Precitene und Meritene (Fettgehalt 8-9 % der Energiezufuhr) keine ausreichende Beeinflussung der Enzymaktivitäten nachweisbar war, wurde in einem Wiederholungsversuch die Diät modifiziert. Durch den Zusatz von Stärkepulver (Mondamin) konnte der Fettgehalt der Nahrung auf ca. 4 % des Brennwertes gesenkt werden.

2.5.2. Fettgewebsbiopsie

Nach Lokalanesthesie mit Ultracain 1 % wurde die Haut unter sterilen Kautelen im Bereich der Paraumbilicalregion durch einen Schnitt eröffnet. Mit feiner Pinzette und Skalpell wurden ca. 0.1 g subkutanes Fettgewebe präpariert. Die mit zwei oder nur einer Kopfnaht verschlossene Wunde heilte in allen Fällen komplikationslos und hinterließ eine unauffällige Narbe.
Die Proben wurden sogleich in kalter Ringerlösung gewaschen, um störende Blutbestandteile zu entfernen. Nach Wägung wurde das Fettstückchen in einem Eppendorf Gefäß durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei - 70^{0} C bis zur Enzymbestimmung gelagert. Eine Minderung der Enzymaktivität durch das Lokalanesthetikum konnte in Vorversuchen ausgeschlossen werden.

2.5.3. Gewebsaufschluß

Die gefrorenen Proben wurden in einem Mikrokolben mit 0.5 ml gekühltem Puffer versetzt. Dieser enthielt:

100 mM MOPS/KOH pH = 7.5
3 mM DTE
1 mM EDTA.

Das Homogenisieren erfolgte mit einem Potter-Homogenisator unter guter Kühlung des Glaskolbens. Fasrige Bindegewebsanteile wurden nicht homogenisiert und blieben zurück. Nach Überführen in ein Eppendorf-Gefäß wurde der Aufschluß unter Verwendung der Silikonöl Technik wie unter 2.4.5. weiterbehandelt.

2.6. Berechnungen

Die Meßergebnisse bei den Tierversuchen stellen Mittelwerte dar. Die Abweichungen sind wenn nicht anders angegeben als S.E.M. dargestellt. Diese errechnen sich als Quotient aus Standardabweichung durch Quadratwurzel der Versuchstierzahl.
Bei Unterschieden wurde die statistische Signifikanz durch den Wilcoxon Test geprüft (19).

Für die Isotopentests wurde die Standardabweichung der Methode jeweils an Hand mehrerer Proben ermittelt. Als gerade meßbarer Wert wurde akzeptiert, wenn sich die 2 s Bereiche von Leerwert und Meßwert nicht überschnitten.

Der Massenindex gibt bei normalem Körperbau über den Adipositasgrad Auskunft. Er errechnet sich aus Körpergewicht

und Größe. Idealwerte liegen für Männer zwischen 21.0 und 23.0.

$$\text{BMI (Massenindex)} = \frac{\text{Gewicht (kg)}}{\text{Größe}^2\ (\text{m}^2)}$$

3. Ergebnisse

3.1. Optische Tests

In die Testsysteme 2.3.1. und 2.3.2. wurden steigende Mengen von verdünntem Homogenat eingesetzt. Es stammte aus Lebern wiedergefütterter Ratten. Im ATP-Citratlyase Test war die Extinktionsänderung bis 0.060 E pro min proportional zum Homogenateinsatz. Dies entsprach einer Enzymkonzentration von 6 mU/ml im Test. Der Fettsäuresyntase Test war mindestens linear bis zu einer Extinktionsänderung von 0.040 E pro min, was einer Enzymkonzentration von 11 mU/ml im Test entsprach.
Diese Grenzen für den maximalen Enzymeinsatz waren bei den Aktivitätsbestimmungen in Rattengeweben zu beachten. Die Homogenate mußten bei Bedarf entsprechend verdünnt werden. Abb. 5 zeigt die Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit vom Enzymeinsatz in beiden optischen Tests.

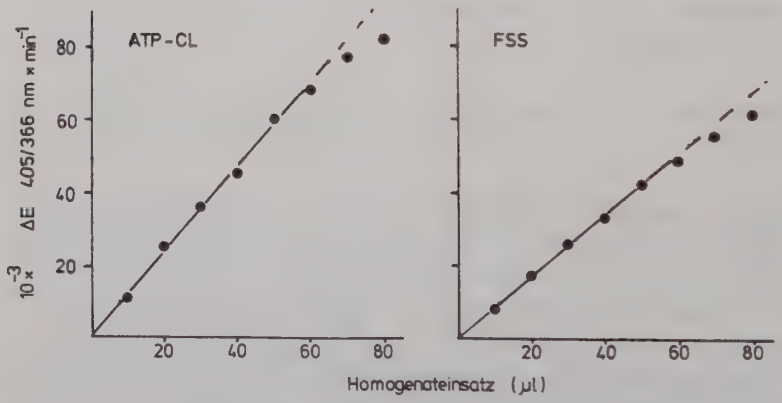

Abb. 5 Linearitätsbereich der optischen Tests.

3.2. Radioisotopentests

Durch die Verwendung von radioaktiv markierten Substraten für die Indikatorreaktion der Arylaminacetyltransferase erhält man eine hochsensible Nachweismethode.

3.2.1. Extraktionsmethode für markiertes Acetanilid

In den Tests waren Substrat und Produkt der Reaktionen radioaktiv markiert. Um zu sinnvollen Ergebnissen zu gelangen, mußte das angewandte Verfahren in der Lage sein, das Produkt möglichst vollständig zu gewinnen und die Substrate bzw. Nebenprodukte weitgehend abzutrennen.
Die unter 2.3.4. beschriebene rationelle Methode zur Abtrennung des markierten Acetanilids wurde auf die qualitative Brauchbarkeit hin überprüft.
Radioaktivität von Substraten und Nebenprodukten im Szintilationsgefäß bildeten den Leerwert. Ein wässriger Ansatz von 0.25 ml, der den Testeinsatz an markiertem Anilin bzw. Citrat enthielt, wurde nach verschiedenen Methoden ausgeschüttelt.
Zugabe von "kaltem" Anilin bzw. Citrat in großem Oberschuß verminderte den Anteil an ausgeschütteltem "heißem" Substrat, und damit den Leerwert.
Die spezifische Aktivität einer Lösung von tritiiertem Acetanilid diente als Standardwert für die Ausbeuteversuche.
Mit einem 0.25 ml Ansatz (50 mM TRIS/HCl pH 7, 1 mM DTE 1 mM EDTA, 50 ul tritiiertes Acetanilid in Chloroform) wurden nach Zugabe der Stoplösung verschiedene Ausschüttelverfahren erprobt.
Die Verluste bei unterschiedlichem Abdampfen von drei ml

Chloroform mit markiertem Acetanilid wurden ermittelt. Mit dem oben beschriebenen Verfahren wurden die in Tab. 4 aufgeführten Leerwerte und Ausbeuten erzielt. Sie beweisen die Brauchbarkeit der Methode.

Tab. 4 Radioisotopentests
Ausbeuten und Leerwerte beim Abtrennen von markiertem Acet-Anilid. Durchschnittswerte aus vier Ansätzen ± SD.

Methode	Ausbeute cpm x 10^3	Relation
direkter Einsatz	137.8 ± 2.8	100 %
Abdampfen	136.4 ± 2.4	99 %
Ausschütteln	135.1 ± 2.7	98 %

Substrat	Aktivität cpm x 10^3	Leerwert cpm	Relation
^{3}H-Anilin	340.3 ± 4.2	3500 ± 180	1.0 %
1.5-^{14}C-Citrat	489.3 ± 6.9	103 ± 10	0.02 %

3.2.2. Acetyl-CoA Bestimmung

Für alle zusammengesetzten Tests mit der Indikatorreaktion der Arylaminacetyltransferase ist die quantitative Umsetzung des angebotenen Acetyl-CoA wichtig.
Durch den Einsatz von verschiedenen Mengen an Acetyl-CoA ins Testsystem nach 2.3.4. wurde die Linearität des Versuchs nachgewiesen. Der Leerwert lag höher als in obigen Vorversuchen und betrug 2.7 % der Radioaktivität des eingesetzten Anilins. Bei Definition der Nachweisgrenze gemäß 2.6. (Berechnungen) ließen sich 25 pMol Acetyl-CoA noch sicher nachweisen. Die Ausbeute an markiertem Acetanilid der Versuchsreihe in Abb. 6 betrug 90 % der aus der spezifischen Aktivität errechneten Werte.

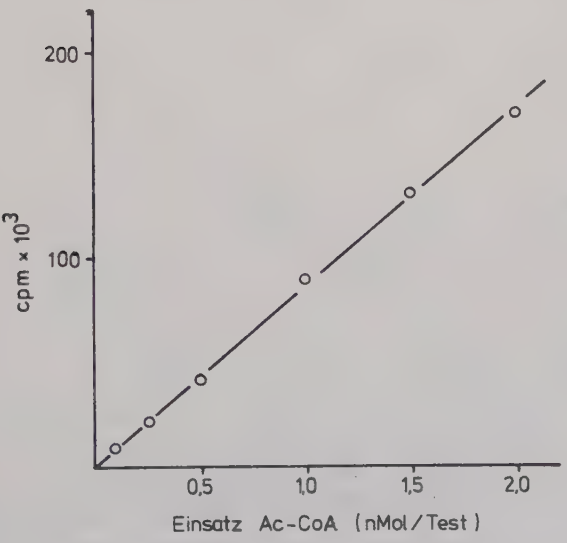

Abb. 6 Radioisotopentests.
Quantitative Bestimmung von Ac-CoA.

3.2.3. Citrat Bestimmung

Durch Kombination mit weiteren, Acetyl-CoA produzierenden Enzymreaktionen lassen sich auch weitere Substrate messen.

Mit der unter 2.3.5. beschriebenen Methode wurde Citrat in verschiedenen Konzentrationen gemessen. Die erzielte Linearität des Testsystems ist aus der Abb. 7 zu ersehen. Die gezeigten Meßwerte entsprachen 88 % der theoretisch erwarteten Radioaktivität; der Leerwert betrug 3 % der eingesetzten Aktivität; die Empfindlichkeit lag damit bei ca. 25 pMol Citrat im Test.

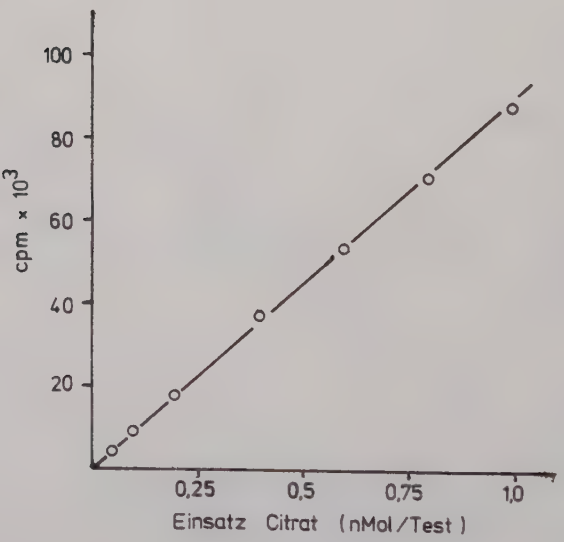

Abb. 7 Radioisotopentests.
Quantitative Bestimmung von Citrat.

3.2.4. Messung der ATP-Citratlyase im Isotopentest

Menschliche Gewebe enthalten wenig ATP-Citratlyase. Die Aktivitäten bewegen sich um oder unterhalb der Empfindlichkeitsgrenze des optischen Tests (30). Durch den Einsatz von Radioisotopen können auch geringere Aktivitäten noch festgestellt werden.
In Gewebshomogenaten gibt es neben der ATP-Citratlyase Reaktion auch noch andere Acetyl-CoA Quellen. So synthetisiert die Acetyl-CoA Synthetase (E.C. 6.2.1.1.) bei Anwesenheit von CoA-SH und ATP Acetyl-CoA aus Acetat. Um bei langer Inkubationszeit solche Störungen auszuschließen, wurde markiertes Citrat eingesetzt.
Vorversuche wurden mit verdünnten Lösungen gereinigter ATP-Citratlyase durchgeführt. Die Enzymstabilität während der Inkubationszeit zeigt Abb. 8. Nach unterschiedlicher

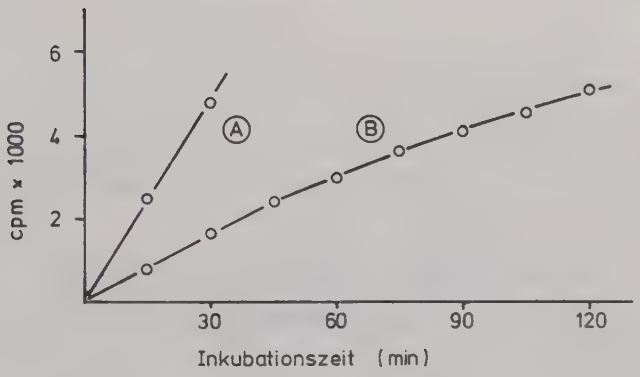

Abb. 8 Radioisotopentests.
Aktivität der ATP-Citratlyase im Testsystem in Abhängigkeit von der Reaktionszeit.
A: Enzymeinsatz 0.3 mU/Test
B: Enzymeinsatz 0.1 mU/Test.

Dauer - Proben mit niedrigem Enzymeinsatz wurden bis zu 120 min, solche mit höherem bis zu 30 min inkubiert - wurden die Ansätze gestoppt. Unabhängig von der Menge an produziertem Acetanilid verlief die Reaktion etwa 30 bis 40 min linear.

In das oben beschriebene Testsystem (2.3.6.) wurden unterschiedliche Mengen an Enzym eingesetzt. Im gesamten untersuchten Bereich, entsprechend Aktivitäten von 0.05 bis 0.5 mU/Test, war der Reaktionsablauf linear. Der Leerwert lag bei 0.02 %, so daß sich ATP-Citratlyase bis zu 0.01 mU mit diesem Test bestimmen ließ. Die Eichkurve zeigt die Abb. 9.

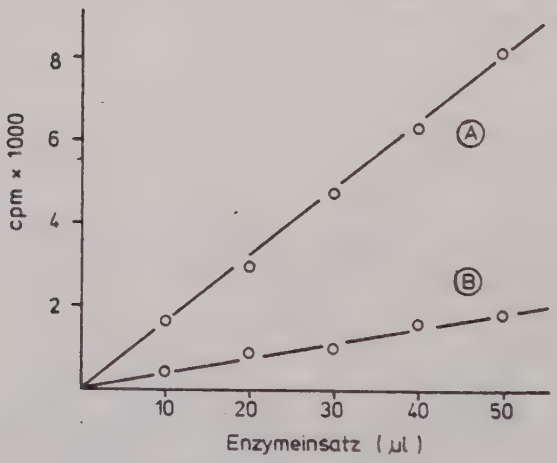

Abb. 9 Radioisotopentests.
Linearität der beschriebenen Methode zur ATP-Citratlyase Aktivitätsbestimmung. Einsatz von Enzymlösungen mit den optisch gemessenen Aktivitäten:
A: 10.5 mU/ml B: 2.8 mU/ml.

3.3. Optimierung des gemeinsamen Gewebeaufschlusses

Aus Gründen der Arbeitsvereinfachung sollte in den folgenden Versuchen die Aktivität von ATP-Citratlyase und Fettsäuresyntase in jeweils einem gemeinsamen Homogenat zu bestimmen sein. Hierfür wurden Aufschlußbedingungen mit den relativ höchsten Aktivitätsausbeuten beider Enzyme ermittelt.
Leber und epididymale Fettgewebsproben von drei Ratten wurden jeweils in drei verschiedenen Puffersystemen aufgeschlossen. Ihre Zusammensetzung zeigt Tab. 5.
Von jedem einzelnen der Rattengewebe erhielt man so drei Homogenate. In jedem wurden die ATP-Citratlyase und die Fettsäuresyntase bestimmt, und ein Durchschnittswert für jeden Aufschlußpuffer errechnet. Für die ATP-Citratlyase wurden im Lebergewebe zwischen 2.5 und 5.1 mU/mg gemessen, für die Fettsäuresyntase zwischen 2.2 und 3.1 mU/mg. Im epididymalen Fettgewebe ergaben sich Werte zwischen 16.7 und 28.3 mU/mg für die ATP-Citratlyase, und zwischen 22.2 und 45.3 für die Fettsäuresyntase.
Tab. 5 zeigt einen Vergleich der relativen Aktivitäten. In Leberaufschlüssen waren die Unterschiede wenig ausgeprägt, MOPS erschien gegenüber TRIS als geringfügig günstigeres Puffersystem. Im Fettgewebshomogenat fiel dieser Unterschied deutlicher aus. Hier erbrachte auch ein pH-Wert von 7.5 gegenüber 8.0 des gleichen Puffers höhere Aktivitäten beider Enzyme.
Aufgrund der dargestellten Versuche entschieden wir uns für einen MOPS-Puffer pH 7.5 mit Zusatz von EDTA und DTE (vgl. Abschnitt 2.4.5.).

Tab. 5 Aufschlußoptimierung
Vergleich der relativen spezifischen Aktivitäten bei Aufschluß in verschiedenen Puffersystemen. Zusammensetzung der Puffer im einzelnen:

1: 100 mM MOPS, 3 mM DTE, 1 mM EDTA, pH = 7.5

2: 100 mM TRIS, 3 mM DTE, 1 mM EDTA, pH = 8.0

3: 100 mM TRIS, 3 mM DTE, 1 mM EDTA, pH = 7.5

Die höchste in jedem Gewebe gemessene Aktivität wurde = 1 gesetzt, die übrigen Werte als entsprechender Bruchteil ausgedrückt. Mittelwerte von drei Ratten.

Puffer	1	2	3
Leber ATP-Citratlyase	1.00	0.94	0.84
Fettsäuresyntase	0.93	1.00	0.86
ep Fett ATP-Citratlyase	0.96	0.53	0.86
Fettsäuresyntase	0.93	0.42	0.71
Durchschnitt	0.96	0.72	0.82

3.4. Stabilität von ATP-Citratlyase und Fettsäuresyntase aus Rattengeweben

3.4.1. Einfrieren der Gewebe

Bei sechs Ratten (Futter Diät III) wurden die spezifischen Aktivitäten von ATP-Citratlyase und Fettsäuresyntase in Leber und epididymalem Fettgewebe sofort nach der Entnahme und in der gefrorenen Probe bestimmt. Dazu wurden Leberkeile und Stücke des epididymalen Fetts nach Abwiegen von 0.2 g in ein Eppendorfgefäß eingebracht und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bei - 70° C wurden sie zwei Tage aufbewahrt. Dem Aufschluß der noch gefrorenen Gewebe in 1 ml Puffer folgten unmittelbar die Aktivitätsbestimmungen.
Abb. 10 gibt einen Oberblick über den Abfall der durchschnittlichen spezifischen Aktivitäten.
Beim Aufschluß der gefrorenen Gewebe war die Proteinausbeute in der Leber um 7 %, in den epididymalen Fettgeweben um 5 % höher als in den frisch homogenisierten Proben. Bezogen auf das g Frischgewicht war also nur in der Leber ein Enzymverlust zu beobachten. Hier überstieg die Minderung der spezifischen Aktivität (36 % für die ATP-Citratlyase, 21 % für die Fettsäuresyntase) den aus den höheren Proteinausbeuten errechneten Abfall.

3.4.2. Einfrieren der Homogenate

Von sechs wiederaufgefütterten Ratten wurden ep Fett und Leberproben aufgeschlossen. Ein Aliquot des Homogenates wurde in einem Eppendorfgefäß schockgefroren, ein weiteres nach Vermischen mit Glyzerin im Volumenverhältnis 1 : 1. Zum Vorgehen siehe auch unter 2.4. Die Bestimmung der Ak-

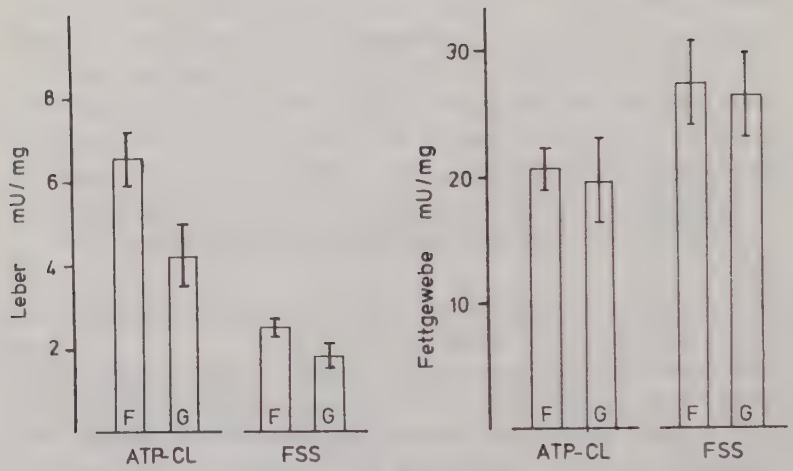

Abb. 10 Enzymstabilität.
Verlust an spezifischer Aktivität durch Frieren Tauen der Gewebeproben. Mittelwert und S.E.M.
n = 6
F = frisch vermessene Proben
G = nach dem Schockfrieren zwei Tage gelagerte und dann vermessene Proben.

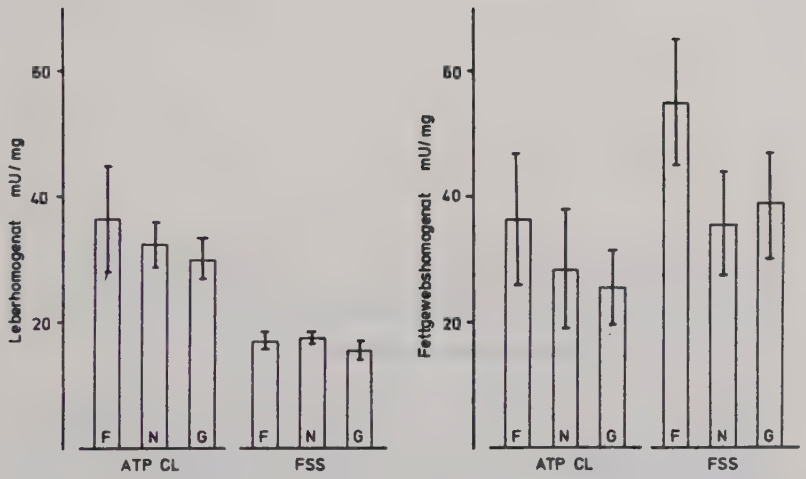

Abb. 11 Enzymstabilität.
Verlust an spezifischer Aktivität durch Frieren und Auftauen der Homogenate. Mittelwerte von sechs Tieren, Abweichung in S.D.
F = frisches Homogenat
N = nach Schockfrieren zwei Tage gelagert
G = vor dem Frieren mit Glyzerin versetzt.

tivität von ATP-Citratlyase und Fettsäuresyntase erfolgte sofort bzw. nach dem Auftauen der zwei Tage bei - 70° C gelagerten Proben.
In den Leberhomogenaten büßten die Enzyme nur wenig an Aktivität ein. Die Enzyme in den Fetthomogenaten verloren durch Einfrieren und Auftauen ca. 30 % ihrer Aktivität. Das Versetzen der Aufschlüsse mit Glyzerin brachte keine Vorteile bezüglich der Haltbarkeit von ATP-Citratlyase und Fettsäuresyntase. Die Meßwerte und deren Relationen sind der Abb. 11 zu entnehmen.

3.4.3. Inkubation von Lebergewebe

Diese Untersuchungen wurden an verschiedenen Rattengruppen durchgeführt. Ihre Daten sind in Abb. 12 zusammengestellt.

Nach Tötung der Tiere und Organentnahme wurden von dem jeweils größten Leberlappen je fünf Keile mit ca. 0.4 g excidiert und in Röhrchen mit 2 ml Aufschlußpuffer überführt. Eine Probe wurde sofort homogenisiert und vermessen. Die übrigen Röhrchen wurden zur Inkubation in ein Wasserbad mit 25° C gestellt. Gewebsaufschluß und Enzymbestimmung erfolgten nach einer, zwei, vier und acht Stunden Inkubationszeit.
Die Ausgangswerte für die spezifischen Enzymaktivitäten in den Lebern waren diät- und körpergewichtsabhängig in den einzelnen Gruppen jeweils verschieden (Abb. 12).
Mit Ausnahme der ATP-Citratlyase in Gruppe 4 verminderte sich in allen Lebern die Enzymaktivität im Verlauf der Inkubation. Das Ausmaß war unterschiedlich. Die ATP-Citratlyase erwies sich als ziemlich stabil; durchschnittlich hatte sie nach vier Stunden noch 84 %, nach acht Stunden 80 % der Ausgangsaktivität.

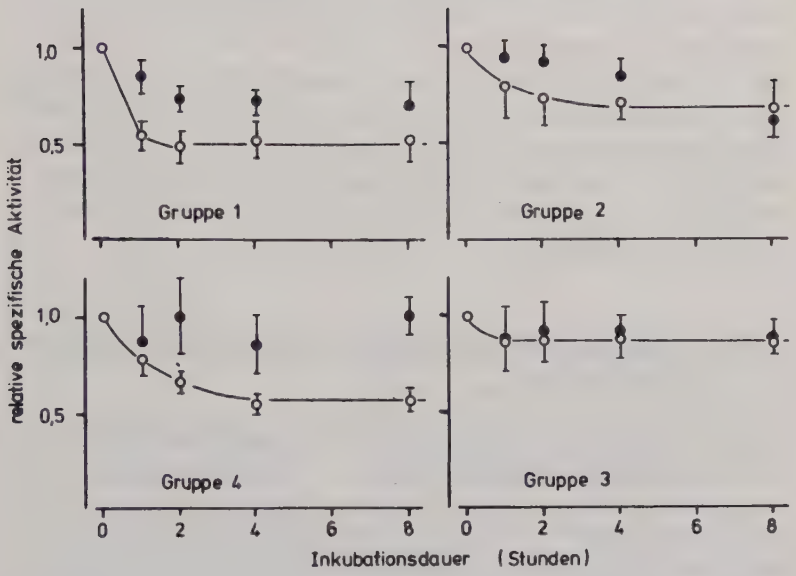

Abb. 12 Enzymstabilität
Relativer Verlust an spezifischer Aktivität von ATP-Citratlyase und Fettsäuresyntase in Leberproben durch Inkubation. Der Ausgangswert wurde gleich 1.0 gesetzt. Mittelwerte und S.D.
● = ATP-Citratlyase o = Fettsäuresyntase
Definition der einzelnen Gruppen:

	Zahl	Gewicht g	Futter	Ausgangswerte ATP-Citrat-lyase	mU/mg Fettsäure-syntase
1	7	200	Diät 3	5.1	2.7
2	3	200	Diät 2	8.7	3.7
3	3	280	Diät 2	5.4	1.7
4	2	180	Diät 1	3.5	2.1
			36 h Hunger		

Zu den Diäten vgl. Abschnitt 2.4.2.

Bei der Fettsäuresyntase fiel auf, daß die Meßwerte nach einem initialen Abfall nicht mehr stark abnahmen. Im Durchschnitt kamen auf die erste Stunde Inkubation 78 %, auf die zweite weitere 13 % des gesamten Aktivitätsverlustes. Es erschien ein Plateau höherer Stabilität erreicht. Dieses lag bei den mit fettreicher Diät gefütterten Ratten höher als bei kohlenhydratreich gefütterten und gehungerten Tieren. Abb. 12 zeigt die Aktivitätseinbußen in den einzelnen Gruppen.

3.5. Diätetische Beeinflussung lipogenetischer Enzyme in Rattengeweben

3.5.1. Induktion von ATP-Citratlyase und Fettsäuresyntase durch Wiederauffütterung

Mit diesem Versuch sollte die Funktion der Stoffwechselregulation der verwendeten Ratten im Hinblick auf Versuch 3.5.2. kontrolliert werden. Bekanntlich läßt sich die Lipogenese bei Ratten, durch Hungern und anschließendes Wiederauffüttern deutlich steigern (vgl. Einleitung, Versuchsablauf siehe auch bei 2.4.3.). Kontroll-, Hunger- und Wiederfütterungsgruppe bestanden aus je sechs Ratten. In Leber, epididymalem ,subkutanem und perirenalem Fettgewebe wurden in entsprechenden Homogenaten die spezifischen Aktivitäten von ATP-Citratlyase und Fettsäuresyntase bestimmt.
Die lipogenetischen Enzyme änderten ihre Aktivität in allen Geweben gleichartig. Nach einem Abfall der spezifischen Aktivitäten während des Hungerns auf weniger als die Hälfte stiegen sie nach Wiederfütterung auf ein mehrfaches des Ausgangswertes an (Abb. 13). Die Unterschiede waren statistisch signifikant ($p < 0.01$). Ober die relativen An-

derungen der spezifischen Aktivitäten gibt die Tab. 6 Auskunft.

Tab. 6 Wiederfütterungsversuch
Relative Änderung der spezifischen Aktivitäten von ATP-Citratlyase und Fettsäuresyntase durch 48 h Hunger und 48 h Wiederfüttern (WF). Der Ausgangswert (Kontrollgruppe) wurde = 1 gesetzt, die übrigen Werte darauf bezogen. Mittelwerte aus sechs Ratten.

	Kontrolle		Hunger	WF
	mU/mg	rel.	rel.	rel.
Leber ATP-Citratlyase	6.6	1	0.33	5.5
Fettsäuresyntase	2.5	1	0.44	6.9
ep Fett ATP-Citratlyase	20.7	1	0.34	1.8
Fettsäuresyntase	27.2	1	0.32	2.0
sc Fett ATP-Citratlyase	4.1	1	0.49	4.0
Fettsäuresyntase	14.8	1	0.37	3.0
pr Fett ATP-Citratlyase	30.4	1	0.21	1.7
Fettsäuresyntase	30.3	1	0.39	2.1

Die Quotienten ATP-Citratlyase/Fettsäuresyntase änderten sich während des Versuchs nur wenig. Lediglich im perirenalen Fettgewebe fiel die ATP-Citratlyase während des Hungerns überproportional stark ab.
Die Ratten nahmen durch das Fasten um ca. 10 % ab, holten den Gewichtsverlust aber bei Wiederauffütterung mehr als auf. Interessant war noch, daß sich der Anteil des Lebergewichts am Körpergewicht verschob. In der Hungerphase fiel er von durchschnittlich 3.8 g Leber/100 g Körpergewicht auf 3.0 g/100 g, um nach der Wiederfütterungsphase auf 4.7 g/100 g anzusteigen.

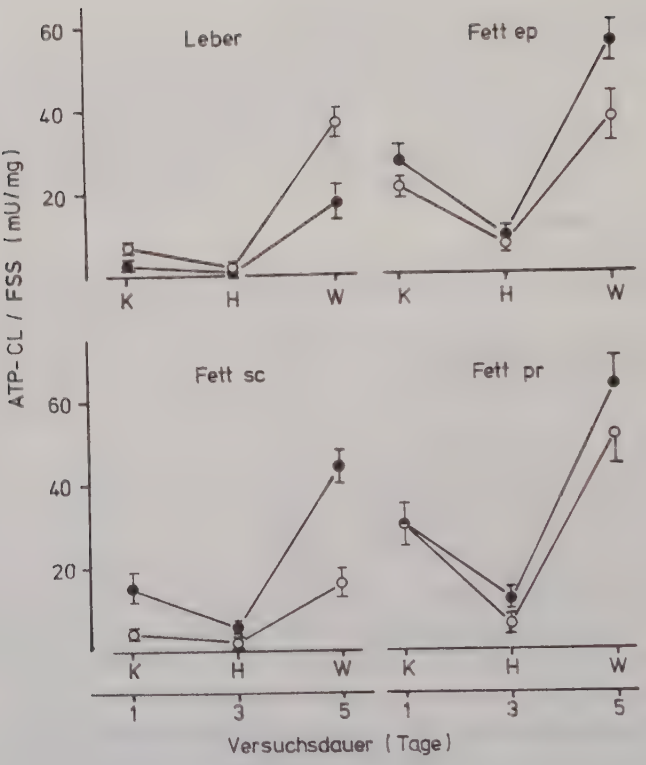

Abb. 13 Wiederfütterungsversuch
Enzymaktivitäten vor dem Versuch, nach 48 Stunden Hunger und nach 48 kohlenhydratreicher Wiederfütterung. Mittelwerte und S.E.M. n = 6
o = ATP-Citratlyase ● = Fettsäuresyntase

3.5.2. Beeinflussung der Enzymaktivitäten durch den Fettgehalt des Futters

In diesem Versuch sollte das Verhalten von Enzymaktivitäten der Lipogenese von langfristig fettreich ernährten Tieren untersucht werden. Diese bekamen vom Abstillen an die ausgewogene Diät II (Diätgruppe II). Weiter wurde bei solchen Tieren die Möglichkeit der Stimulation lipogenetischer Enzyme durch Umstellung des Futters auf die kohlenhydratreiche Diät I untersucht. Diese Ratten wurden als "Diätwechsler" bezeichnet. Als Kontrolle dienten während des gesamten Zeitraumes kohlenhydratreich gefütterte Ratten (Diätgruppe I).
Der Versuchsablauf ist unter 2.4.3. dargelegt.
Die Tiere wuchsen unter Diät I und Diät II gleich gut. Die Abb. 14 zeigt den Zusammenhang von Körpergewicht und dem Alter der Ratten. Zwischen 60 und 240 g Körpergewicht war die Zunahme mit täglich ca. 7 g annähernd linear. Auch die morphologische Erscheinung war gleich, Ratten der Diätgruppe II erschienen nicht fetter. Bei den Diätwechslern trat anfangs eine Verzögerung des Wachstums auf, die nach zehn Tagen wieder kompensiert war.
Futterverbrauch und Futterverwertung pro Ratte waren in beiden Gruppen gleich (Abb. 15). Bei der verwendeten ad-libitum-Fütterung konsumierte beispielsweise eine 50 g schwere Ratte täglich 9 g, eine 250 g schwere Ratte 24 g Futter pro Tag.

Ober den Anteil der Leber, bzw. des epididymalen Fettpolsters am Gesamtkörpergewicht gibt die Tab. 7 Auskunft.

In Leber, epididymalem, subkutanem und perirenalem Fettgewebe wurden die spezifischen Aktivitäten von ATP-Citratlyase und Fettsäuresyntase bestimmt. Die Durchschnittswerte ergaben Gruppen von sechs bis acht Ratten.

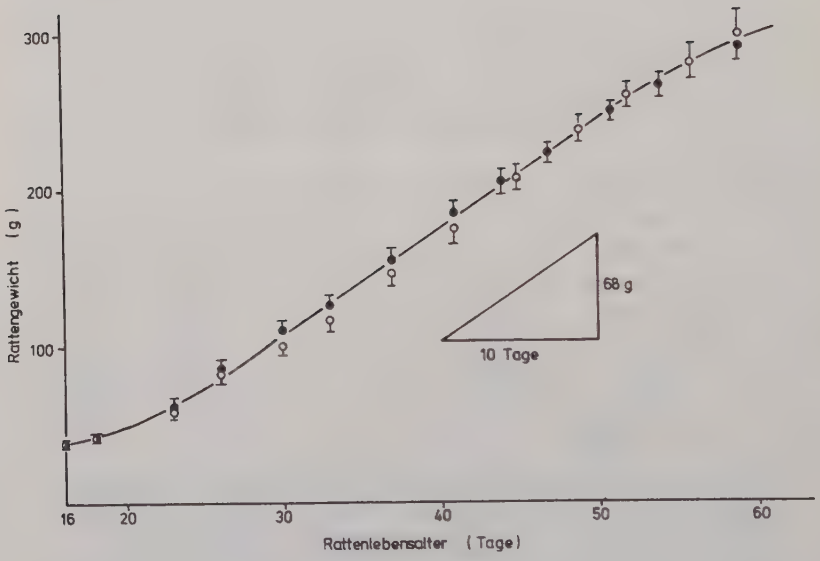

Abb. 14 Rattendiätversuch
Gewichtsentwicklung im Versuchsverlauf. Mittelwerte und S.D. n = 6
o = Diätgruppe I (kohlenhydratreich ernährt)
● = Diätgruppe II (ausgewogen ernährt)

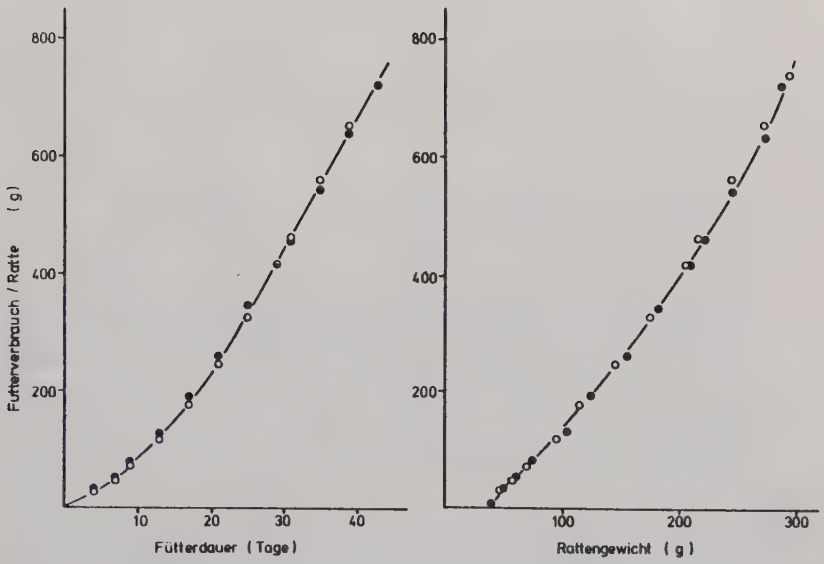

Abb. 15 Rattendiätversuch
Durchschnittlicher, kumulativer Futterverbrauch einer Ratte. Links im Versuchsverlauf, rechts bezogen auf das Körpergewicht.

Tab. 7 Rattendiätversuch
Anteil von Leber und ep Fettpolster am gesamten Rattengewicht. Durchschnittswerte von sechs Tieren. ± SD

Rattengewicht		100 g	200 g	300 g
Leber	Diät I	4.6 ± 0.25	4.5 ± 0.21	3.9 ± 0.19
g/100 g	Diät II	4.9 ± 0.25	4.9 ± 0.37	4.3 ± 0.40
ep Fett	Diät I	0.34 ± 0.04	0.76 ± 0.06	0.83 ± 0.07
g/100 g	Diät II	0.28 ± 0.03	0.73 ± 0.06	0.81 ± 0.07

Die jeweilige Anzahl ist Abb. 3 (Versuchsbeschreibung Abschnitt 2.4.3.) zu entnehmen.

Bei neugeborenen Ratten konnte kein Fettgewebe präpariert werden, bei 40 g schweren Tieren nur mit geringer Ausbeute. Deshalb sind spezifische Aktivitäten neugeborener Ratten nur für die Leber angegeben. Sie lagen höher als bei 40 g schweren Tieren, dem Ausgangswert. Gewebe dieser gerade abgestillten Ratten wiesen sehr niedrige Aktivitäten auf, in der Leber war die Fettsäuresyntase nicht meßbar.

Mit Beginn der Fütterung erfolgte ein kräftiger Anstieg. Mit 100 g lagen sowohl in Diätgruppe I als auch in Diätgruppe II, die Werte der ATP-Citratlyase und Fettsäuresyntase hoch über dem Ausgangswert. Die Aktivitäten beider Enzyme zeigten qualitativ gleiche Abhängigkeit von der Diätform und dem Tiergewicht.
Die Werte für ATP-Citratlyase und Fettsäuresyntase waren bei der Diätgruppe I in allen Geweben höher als in Diätgruppe II. Alle Unterschiede waren statistisch signifikant ($p < 0.01$). Der relative Unterschied der Aktivität in

Diätgruppe I zu Diätgruppe II nahm im Verlauf des Versuchs zu (Tab. 8), d.h. bei steigendem Körpergewicht sanken die Enzymaktivitäten bei ausgewogen ernährten Tieren stärker ab als bei fettarm ernährten.

In der Diätgruppe I waren die Aktivitäten bei 100 und 200 g annähernd gleich, erst die Werte für die 300 g schweren Tiere fielen deutlicher ab.
Die ATP-Citratlyase sank in der Leber auf 84 %, in den Fettgeweben durchschnittlich auf 63 % der spezifischen Aktivitäten in Geweben von 100 g schweren Tieren. Die Fettsäuresyntase verlor in der Leber 45 %, in den Fettgeweben im Durchschnitt 26 %.
In der Diätgruppe II war der gewichtsabhängige Rückgang der Enzymaktivitäten gleichmäßiger; die ATP-Citratlyase fiel bei 300 g schweren Ratten auf 65 % in Leber und epididymalem Fett bzw. auf 35 % in subkutanem Fett und perirenalem Fett gegenüber der Aktivität bei 100 g schweren Ratten. Die Fettsäuresyntase sank auf 40 % (Leber) und zwischen 20 und 30 % in den Fetten. Diese relative Einbuße an Aktivität war in der Diätgruppe II deutlich ausgeprägter.

ATP-Citratlyase und Fettsäuresyntase ließen sich in allen Geweben durch Umstellung von Diät II auf Diät I stimulieren.
Die "Diätwechsler" erreichten mit in den einzelnen Geweben unterschiedlicher Geschwindigkeit nach 14-tägiger kohlenhydratreicher Fütterung Enzymaktivitäten wie in der Kontrollgruppe (Diät I).
Die ATP-Citratlyase erreichte den Kontrollwert in der Leber nach sieben Tagen, die Fettsäuresyntase bereits nach drei Tagen Futterwechsel. In den Fettgeweben verdoppelten sich in sieben Tagen die spezifischen Enzymaktivitäten.

Einen Oberblick der Ergebnisse zeigen die Abb. 16 bis 19.

Der Quotient ATP-Citratlyase/Fettsäuresyntase war in Fettgeweben für die Diätgruppe I höher, in der Leber für die Diätgruppe II. Bei den "Diätwechslern" glich er sich an die Kontrollgruppe an. Tab. 9 zeigt die Werte für Leber und subkutanes Fettgewebe.

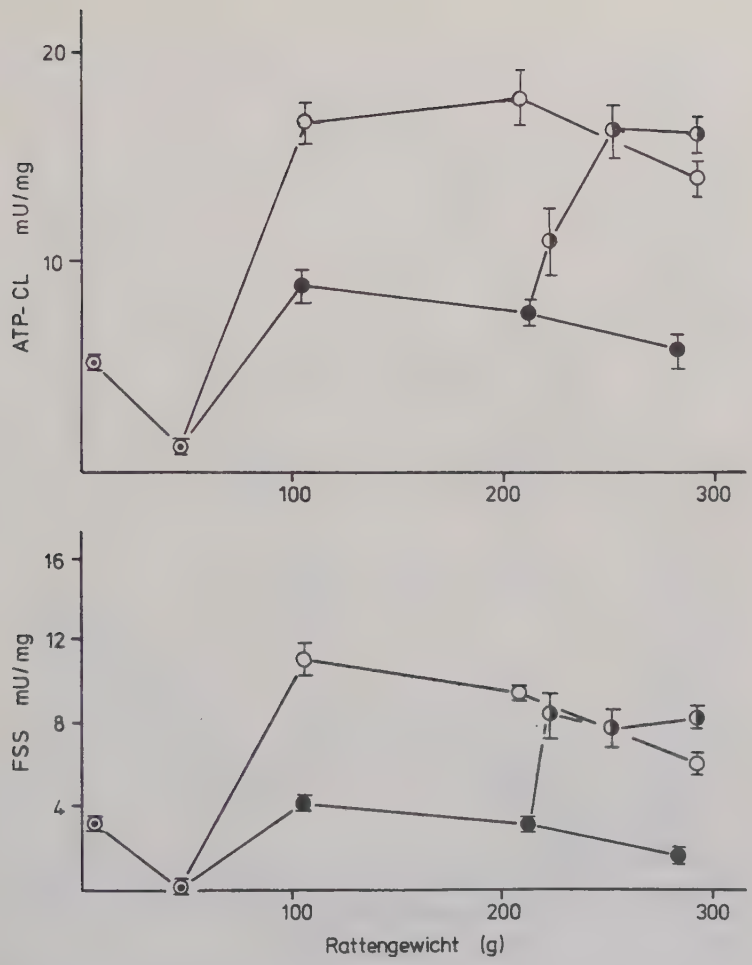

Abb. 16 Rattendiätversuch
Spezifische Aktivitäten von ATP-Citratlyase und Fettsäuresyntase in der Leber. Mittelwerte und S.E.M. Das jeweilige n ist der Abb. 3 zu entnehmen. ◎ = Startgruppe (Rattenbabies); ● = Diätgruppe II (ausgewogenes Futter); o = Diätgruppe I (kohlenhydratreiches Futter); ◑ = Diätwechsler

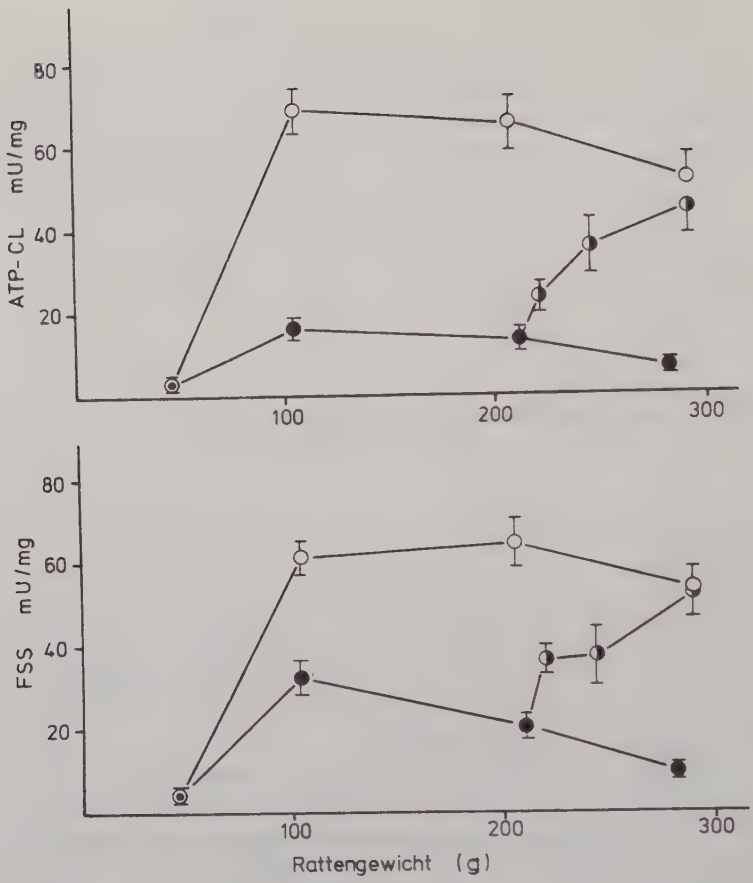

Abb. 17 Rattendiätversuch
Spezifische Aktivitäten von ATP-Citratlyase und Fettsäuresyntase im sc Fett. Mittelwerte und S.E.M. n in Abb. 3.

◎ = Startgruppe ● = Diätgruppe II
o = Diätgruppe I ◑ = Diätwechsler

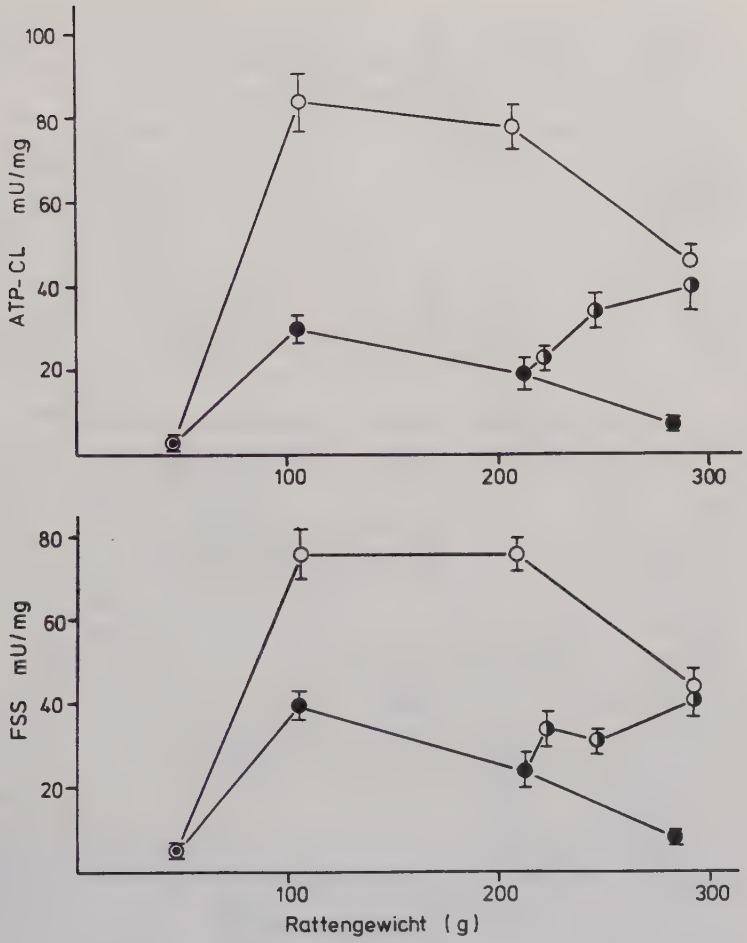

Abb. 18 Rattendiätversuch
Spezifische Aktivitäten von ATP-Citratlyase und Fettsäuresyntase im ep Fett. Mittelwerte und S.E.M. n in Abb. 3.

⊙ = Startgruppe ● = Diätgruppe II
o = Diätgruppe I ◑ = Diätwechsler

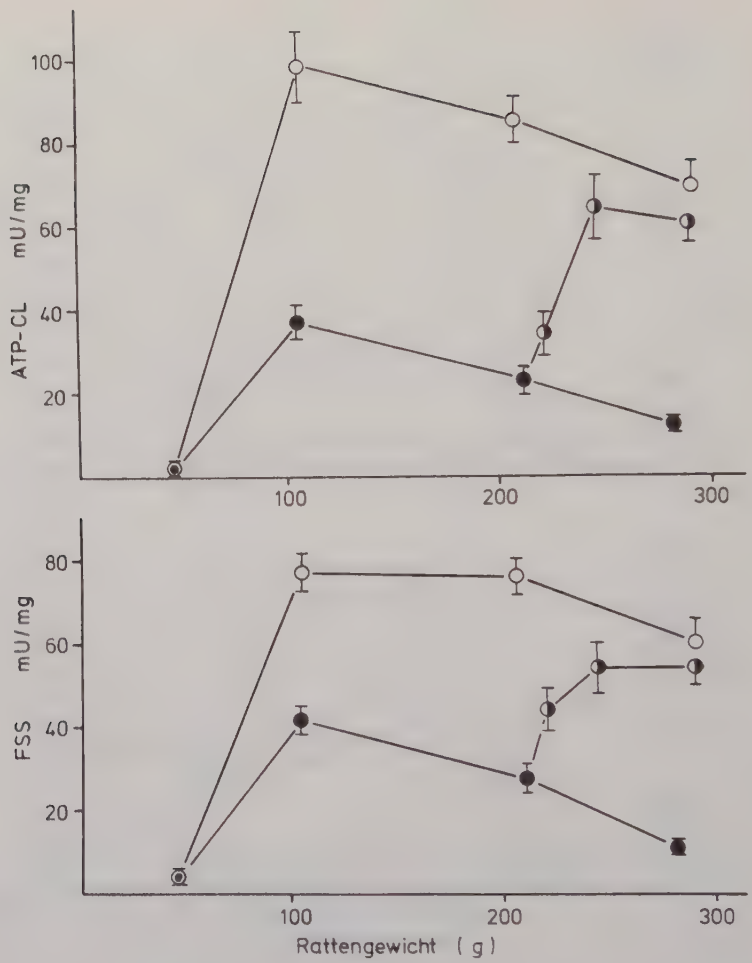

Abb. 19 Rattendiätversuch
Spezifische Aktivitäten von ATP-Citratlyase und Fettsäuresyntase im pr Fett. Mittelwerte und S.E.M. n in Abb. 3.

⊙ = Startgruppe ● = Diätgruppe II
o = Diätgruppe I ◑ = Diätwechsler

Tab. 8 Rattendiätversuch
Quotienten der spezifischen Aktivitäten von ATP-Citratlyase und Fettsäuresyntase aus Diät I/Diät II bei unterschiedlich schweren Tieren und Geweben.

Gewicht		100 g	200 g	300 g
Leber	ATP-Citratlyase	1.9	2.5	2.5
	Fettsäuresyntase	2.7	3.0	3.8
ep Fett	ATP-Citratlyase	2.8	4.0	6.6
	Fettsäuresyntase	1.9	3.1	5.8
sc Fett	ATP-Citratlyase	4.4	4.9	9.0
	Fettsäuresyntase	1.9	3.2	6.1
pr Fett	ATP-Citratlyase	2.7	3.6	5.9
	Fettsäuresyntase	1.8	2.8	5.2

Tab. 9 Rattendiätversuch
Quotient aus den spezifischen Aktivitäten ATP-Citratlyase/Fettsäuresyntase in Leber und sc Fett bei den verschiedenen Meßpunkten.

Leber	100 g	200 g	3 Tage	7 Tage	14 Tage
Diät II	2.2	2.5			3.6
II - I			1.3	2.1	2.0
Diät I	1.5	2.0			2.3

sc Fett	100 g	200 g	3 Tage	7 Tage	14 Tage
Diät II	0.49	0.67			0.66
II - I			0.64	0.96	0.83
Diät I	1.11	1.05			0.97

3.6. Beeinflussung lipogenetischer Enzyme im menschlichen Fettgewebe durch kohlenhydratreiche Formeldiät

Diese Untersuchungen sollten in Anlehnung an die oben beschriebenen Tierversuche Hinweise liefern, ob sich die niedrigen Aktivitäten von ATP-Citratlyase und Fettsäuresyntase auch beim Menschen diätabhängig stimulieren lassen.
Vier männliche Versuchspersonen (Vp) stellten für drei Wochen ihre Ernährung auf eine fettarme Formeldiät (Abschnitt 2.5.1.) um. Zwei von ihnen nahmen auch an einem weiteren, sechswöchigen Versuch mit einem besonders niedrigen Fettanteil in der Nahrung (2.5.1.) teil.
Die Probanden waren gesund und bis auf Vp 4 schlank.
Die klinisch-chemischen Parameter wurden während des Versuchs überwacht und blieben im Normbereich. Vp 2 litt im Versuch 2 in der Woche vor der letzten Biopsie an einer unspezifischen Gastroenteritis und verlor 3 kg an Gewicht.

Vor Beginn der Diät, am 14., 21. und 41. Diättag wurden Proben aus dem subkutanen Fettgewebe entnommen und nach entsprechendem Aufschluß die spezifischen Aktivitäten von ATP-Citratlyase und Fettsäuresyntase mit Isotopentests gemessen.

Die Ergebnisse zeigt die Tab. 10. Die Werte der ATP-Citratlyase waren sehr niedrig, teilweise nicht meßbar; die der Fettsäuresyntase höher. Erhöhte Enzymaktivitäten wurden nur in der Anfangsphase des Versuchs mit der durch Stärkepulver angereicherten Diät erhalten. Die Fettsäuresyntase erreichte hier Werte über 2 mU/mg Protein, die ATP-Citratlyase maximale Aktivitäten um 1 mU/mg Protein.

Tab. 10 Diätversuch beim Menschen
spezifische Aktivitäten von ATP-Citratlyase und Fettsäuresyntase im sc Fettgewebe.
Fertige Formeldiät ohne Kennzeichnung, 1) modifizierte Diät (erhöhter Kohlenhydratanteil)
BMI: Masseindex (2.6.)

	BMI	ATP-Citratlyase mU/mg 0. Tag	14. Tag	21. Tag	41. Tag
Vp 1	21.3	0.14	n.m.	0.05	-
1):		0.07	1.11	0.91	0.73
Vp 2	22.1	0.12	0.05	0.10	-
1):		n.m.	0.25	0.15	0.16
Vp 3	22.7	0.11	0.05	0.05	-
Vp 4	25.3	0.10	n.m.	n.m.	-
		Fettsäuresyntase mU/mg			
Vp 1	21.3	0.79	0.91	0.60	-
1):		n.m.	2.72	1.31	1.82
Vp 2	22.1	0.13	0.82	0.92	-
1):		0.12	2.13	0.86	0.16
Vp 3	22.7	0.76	1.68	1.09	-
Vp 4	25.3	1.11	0.27	0.18	-

4. Diskussion

4.1. Methoden

Durch den Einsatz von Isotopen in das Indikatorsystem der Arylaminacetyltransferase entstanden hochempfindliche Meßmethoden. Die Meßgrenze für die Substrate Citrat und Acetyl-CoA lag mit 25 pMol um den Faktor 10 günstiger als bei der optischen Bestimmung (3). Für die ATP-Citratlyase konnten noch 0.01 mU/Test gemessen werden. Der optische Test dagegen hat seine Grenze bei 0.1 mU/Test. Diese Unterschiede beziehen sich auf verdünnte Reinenzymproben.

Gewebshomogenate können nur bis zu einer gewissen Proteinkonzentration in den optischen Test eingesetzt werden, da bei starker Trübung der Proben das Rauschen des Meßverstärkers der Ablesbarkeit Grenzen setzt. Den Isotopentest beeinträchtigen solche Einflüsse nicht; auch der Einsatz von konzentriert aufgeschlossenen Gewebeproben liefert eindeutige Werte. Dies verbessert die Empfindlichkeit bei solchen Messungen nochmals.
Der Isotopentest erwies sich über einen weiten Bereich des Enzymeinsatzes als linear, soweit eine gewisse Inkubationszeit nicht überschritten wurde. Bei längerer Inkubation (> 45 min) verlor die ATP-Citratlyase an Aktivität, auch wenn die Ausbeute an markiertem Acetanilid noch klar im linearen Testbereich lag (3.2.4.).
Im Reaktionsverlauf der ATP-Citratlyase spielen SH-Gruppen im aktiven Zentrum des Enzyms eine entscheidende Rolle (11). Möglicherweise reichte der DTE-Zusatz im Test nicht aus, um diese Gruppen im Verlauf langer Inkubationszeiten vor oxidativen Einflüssen zu schützen.

Aus verschiedenen Möglichkeiten wurde der optimale Aufschlußpuffer ermittelt (3.3.).

Der günstigste pH-Wert für das Aufschlußmedium lag zwischen den Testoptima beider Enzyme. Für die ATP-Citratlyase wurden 8.0 (24), für die Fettsäuresyntase der Ratte 6.9 (21) bestimmt.
Ein Puffersystem aus der Good-Gruppe, im verwendeten pH-Bereich MOPS, erwies sich als besonders schonend sowohl für die ATP-Citratlyase als auch für die Fettsäuresyntase.

Für die Rattendiätversuche wurden die Enzyme in den frisch aufgeschlossenen Proben vermessen. Auf verschiedene Weise konservierte Proben erbrachten niedrigere spezifische Aktivitäten (3.4.1. und 3.4.2.).
ATP-Citratlyase und Fettsäuresyntase verloren durch Gefrieren und Auftauen nur im Leber-, nicht aber im Fettgewebe an Aktivität. Die niedrigere spezifische Aktivität im gefrorenen Fettgewebe ist durch die höhere Proteinausbeute bei solchen Proben gegenüber dem frisch aufgeschlossenen Gewebe zu erklären.
Vermutlich erhöht der Gefriervorgang den Anteil der Membranproteine im löslichen Oberstand. ATP-Citratlyase und Fettsäuresyntase sind als cytosolische Enzyme davon nicht betroffen.
Beim Frieren und Tauen der Homogenate erwiesen sich die Enzyme nur in den Fettgewebsproben als empfindlich. In den Leberhomogenaten wurden wesentliche Aktivitätseinbußen durch diese Behandlung nicht beobachtet. Auch andere Untersucher (21, 32) bestätigten dies für den Fettsäuresyntasekomplex.

In einem weiteren Stabilitätsversuch wurden Rattenleberstücke bei 25^{o} C in Aufschlußpuffer bis zu acht Stunden inkubiert. Beide lipogenetischen Enzyme verloren dabei an Aktivität. Sicher spielen proteolytische Enzyme eine Rolle. Für die ATP-Citratlyase wurden in vivo Halbwertszeiten

zwischen 14 und 27 Stunden ermittelt (20). Damit ist der Verlust von ca. 20 % der Aktivität nach acht Stunden Inkubation gut vereinbar.
Der initiale Verlust und die anschließende Plateauphase der Fettsäuresyntase Aktivität deuteten entweder auf eine schnelle, teilweise Inaktivierung des Enzyms oder auf das Vorhandensein von zwei Enzymmodifikationen mit unterschiedlicher Aktivität und Stabilität hin. Die von mehreren Untersuchern beschriebene Inaktivierung der Fettsäuresyntase durch enzymatische Abspaltung der prostetischen Gruppe 4-Phosphopantetnein (56, 70, 72, 74) kann die hier beobachtete Plateauphase höherer Stabilität nur schlecht erklären. Der Verlust der prostetischen Gruppe müßte die gesamte Aktivität zum Erliegen bringen.
Porter et al. fanden in Taubenleber zwei Formen der Fettsäuresyntase mit hoher und niedriger Aktivität, die durch Interkonvertierung ineinander übergeführt werden können (53). Angenommen eine solche dephosphorylierte, hochaktive Form ist gegenüber den Inaktivierungsprozessen in der Zelle empfindlicher, so würde dies die Inkubationsversuche erklären. Die unterschiedliche Höhe der Plateauphase wäre dann durch den Stoffwechsel bedingten Phosphorylierungsgrad bestimmt worden.

Möglicherweise unterliegen lipogenetische Enzyme nach dem Tod eines Organismus ähnlichen Inaktivierungsvorgängen wie im Inkubationsversuch. Das hieße dann für ATP-Citratlyase und Fettsäuresyntase in menschlichen Geweben, daß die in Autopsieproben gemessenen Aktivitäten (17, 33) nur wenig geringer sind, als in den Biopsieproben.

4.2. Diätversuche

Durch 48 Stunden Hungern fiel die spezifische Aktivität von ATP-Citratlyase und Fettsäuresyntase in der Rattenleber auf ca. 40 % des Ausgangswertes ab, um dann bei kohlenhydratreicher Wiederfütterung auf das sechsfache anzusteigen. In den Fettgeweben folgte einem Abfall auf 35 % ein geringerer Anstieg. Die Anpassung der Fettsäuresynthese, sowie der spezifischen Aktivitäten lipogenetischer Enzyme in Rattengeweben an derartige Veränderungen der Stoffwechsellage ist von mehreren Autoren beschrieben. Die dort gemessenen Änderungen der sowohl ATP-Citratlyase (4, 21, 24, 34), als auch der Fettsäuresyntase (1, 2, 12, 14, 21) stimmen größenordnungsmäßig mit den Ergebnissen dieser Arbeit überein.
ATP-Citratlyase und Fettsäuresyntase wiesen paralleles Verhalten bei der Adaption an die Stoffwechselbedingungen auf. Srere und Foster beobachteten in den ersten Stunden des Hungerns und Wiederfütterns zwar eine Anpassung der Fettsäuresyntheserate, aber keinen Abfall bzw. Anstieg der ATP-Citratlyase Aktivität (16, 63). Sie schlossen auf eine fehlende Beteiligung der ATP-Citratlyase in der Kurzzeitregulation der Fettsäuresynthese. Dies muß kein Widerspruch zu obigen Ergebnissen sein, da nach 48 Stunden langfristige Adaptionsmechanismen überwiegen können.

Bei der Regulation dieser lipogenetischen Enzyme wirken offenbar mehrere Mechanismen zusammen.
Die spezifische Aktivität der ATP-Citratlyase wird durch die Enzymmenge bestimmt (63), die Regulation setzt an der Synthese des Enzyms an (20). Eine neuere Untersuchung zeigt den Einfluß eines Inhibitors aus wiedergefütterten Ratten auf den Abbau der ATP-Citratlyase durch lysosomale Enzyme (51). Für die ATP-Citratlyase wurde Interkonvertie-

rung ohne Änderung der spezifischen Aktivität nachgewiesen (23). Ober die physiologische Bedeutung dieses Vorgangs herrscht noch genausowenig Klarheit, wie über den Einfluß der Anionenkonzentration auf die ATP-Citratlyase (27).

Auch für die Fettsäuresyntase wurde der Einfluß der Stoffwechsellage auf die Enzymsynthese nachgewiesen (6, 7, 20). Eine wichtige Rolle scheint der Einbau bzw. die Abspaltung des 4-Phosphopantethein bei der Regulation zu spielen. Enzymatische Abspaltung der prosthetischen Gruppe inaktiviert die Fettsäuresyntase (56, 70, 72). Der höhere Umsatz an Pantethein gegenüber dem Gesamtkomplex deutet auf einen kontrollierenden Mechanismus hin (71, 75). Mehrere Untersucher fanden inaktive Vorläufer der Fettsäuresyntase (Apoenzyme), die mit bestimmten Enzymfraktionen unter Beteiligung von CoA-SH in die aktive (holo-) Fettsäuresyntase umgewandelt wird (9, 31, 41, 53). In Lebern diabetischer Ratten ließ sich die Fettsäuresyntase-Aktivität ohne Zunahme des Enzymproteins durch in vivo Vorbehandlung mit Triothyronin stimulieren (15). Die Aktivitätszunahme lief parallel zum Einbau von markiertem Pantethein.
Porter et al. wiesen auf den möglichen Einfluß der Interkonvertierung auf die Fettsäuresyntase Aktivität in der Taubenleber hin (53). In anderen Organismen ist die Existenz dieser Regulation noch nicht erwiesen.

ATP-Citratlyase und Fettsäuresyntase in Rattengeweben adaptierten sich bei ausgewogener Ernährung an die hohe exogene Zufuhr von Fetten.
Während der Stillperiode geht die Fettsäuresynthese bei den Rattenbabies stark zurück. Bei einem Gehalt der Rattenmilch an sehr gut verwertbaren Fetten von 16 % (59) ist offensichtlich keine Eigenproduktion notwendig. Die spezifischen Aktivitäten von ATP-Citratlyase und Fettsäuresyntase sind in allen untersuchten Geweben von mit ausgewoge-

ner Diät (Fettanteil 43 %) gefütterten Ratten deutlich niedriger als bei denen, die mit kohlenhydratreicher Diät ernährt wurden (3.5.2.). Glas fand für die ATP-Citratlyase vergleichbare Ergebnisse. Die Unterschiede der beiden Diätgruppen waren bei vom Abstillen an mit spezieller Diät gefütterten Ratten etwas größer, als wenn die Umstellung wie bei Glas (21) erst mit höherem Gewicht erfolgt.
Das gleiche Wachstum und die gleiche Futterverwertung in beiden Diätgruppen (Abb. 14, 15, S. 48,49) schlossen aus, daß die niedrigen Aktivitäten durch unterschiedliches Freßverhalten bedingt wurden. Die Enzymaktivitäten von ATP-Citratlyase und Fettsäuresyntase wurden durch die Zufuhr von Kohlenhydraten und Fettsäuren geregelt.
Durch die Umstellung auf kohlenhydratreiches Futter waren die Enzymaktivitäten in allen Geweben stimulierbar. Die Adaption der Fettsäuresynthese an hohe exogene Fett-Zufuhr war also bei 200 g schweren Ratten reversibel. Im Fettgewebe dauerte die Anpassung von ATP-Citratlyase und Fettsäuresyntase an die Futterumstellung ca. 14 Tage. Die Reaktion von Geweben ausgewogen ernährter Ratten auf kohlenhydratreiches Futter war also viel träger als diejenige von gehungerten Ratten (3.5.1.), und schoß nicht über den Kontrollwert kohlenhydratreich ernährter Tiere hinaus.

Ein ähnliches Experiment sollte die Stimulierbarkeit der Lipogenese durch Umstellung auf kohlenhydratreiche Diät im menschlichen Fettgewebe zeigen (3.6.).
Die Aktivität der ATP-Citratlyase im subkutanen Fettgewebe des Menschen ist sehr niedrig. Bei maximaler Kapazität stellte sie etwa 20 % der von der Fettsäuresyntase benötigten Substrate Acetyl-CoA bzw. Malonyl-CoA (Tab. 10, S. 59). Deshalb ist anzunehmen, daß der Citratweg beim Mensch nur eine untergeordnete Funktion hat, und die ATP-Citratlyase nicht der geschwindigkeitsbestimmende Schritt

der Fettsäuresynthese ist. Für die Acetyl-CoA Bereitstellung kommen dann andere Reaktionen in Betracht (25, 66).

Für die Aktivität der menschlichen ATP-Citratlyase unter besonderen Nahrungsumständen wurden erst wenige Daten gesammelt (30). Die hier gefundenen Werte im subkutanen Fettgewebe zeigen, daß auch bei langfristig fettarmer Ernährung die ATP-Citratlyase nicht oder nur wenig stimulierbar ist.

Die für die Fettsäuresyntase im subkutanen Fettgewebe gemessenen Aktivitäten von ca. 0.6 mU/mg Protein stimmen mit den Werten anderer Untersucher überein (17, 33). Bei kohlenhydratreicher Diät stiegen die Werte in einigen, wenn auch nicht in allen Fällen an (Tab. 10, S. 59).
Bei Patienten mit fettarmer parenteraler Ernährung und bei Alkoholikern wurden ebenfalls Aktivitäten in der gleichen Größenordnung gemessen (17).
Der niedrige Wert für die Fettsäuresyntase, der bei der Vp 2 nach sechs Wochen erhalten wurde, ist womöglich mit einer gestörten Nahrungsresorbtion durch die Gastroenteritis zu erklären.

Eine Gegenüberstellung der Ergebnisse von Ratte und Mensch erbringt folgendes:
Bezüglich der Bereitstellung von Acetyl-CoA für die Fettsäuresynthese unterscheidet sich der Mensch zumindest im subkutanen Fettgewebe auch von der ausgewogen ernährten Ratte, bei der ja der Citratweg eine dominierende Rolle spielt. Auch die im Vergleich zur Fettsäuresyntase überschießende Regulation der ATP-Citratlyase durch den Wechsel auf kohlenhydratreiches Futter in Rattenfettgeweben (Tab. 9, S. 57) konnte beim Menschen nicht beobachtet werden.
Bei 300 g schweren, ausgewogen ernährten Ratten fanden

sich in der Leber Fettsäuresyntase-Aktivitäten, die mit menschlichen Werten (17, 33) vergleichbar waren.
Abb. 20 verdeutlicht demgegenüber, daß im subkutanen Fettgewebe (Mensch 0.6, Ratte 8.6 mU/mg) für dieses Enzym unter allen Ernährungsbedingungen erhebliche quantitative Unterschiede zwischen Mensch und Ratte bestehen bleiben. Durch Umstellen auf eine fettarme (< 5 %) Diät wurde nach vierzehn Tagen bei Vp 1 ein vierfacher Anstieg beobachtet. Bei der Ratte betrug die Stimulation das sechsfache, so daß sich der Unterschied eher noch vergrößerte.

Die hier untersuchte Abhängigkeit von der Nahrungszusammensetzung stellt einen Aspekt im Hinblick auf die Beeinflussung der de-novo Lipogenese dar.
Daneben sind auf Grund anderer Arbeiten mit Sicherheit auch Speziesunterschiede zu berücksichtigen. Beispielsweise läuft beim Affen (66) die Fettsäuresynthese ähnlich wie bei der Ratte in Leber und Fettgeweben ab, während bei Vögeln (28) nur die Leber, bei Wiederkäuern (73) nur das Fettgewebe Bedeutung besitzt.
Auch die Höhe des Grundumsatzes in Bezug zur Körpermasse (spezifischer Grundumsatz) könnte die Absolutwerte für benötigte Stoffwechselkapazitäten mitbestimmen. Bei der Ratte liegt der spezifische Grundumsatz vier bis fünfmal so hoch wie beim Menschen (18). Grundsätzlich können aber auch größere Tierarten mit niedrigerem spezifischem Energiebedarf wie z.B. Schwein oder Rind wesentlich höhere Aktivitäten der Fettsäuresyntase aufweisen (67, 73) als der Mensch.

Abschließend ist festzustellen, daß die Ratte und prinzipiell auch der Mensch eine für die Fettsynthese aus Kohlenhydraten geeignete Enzymausstattung besitzen.

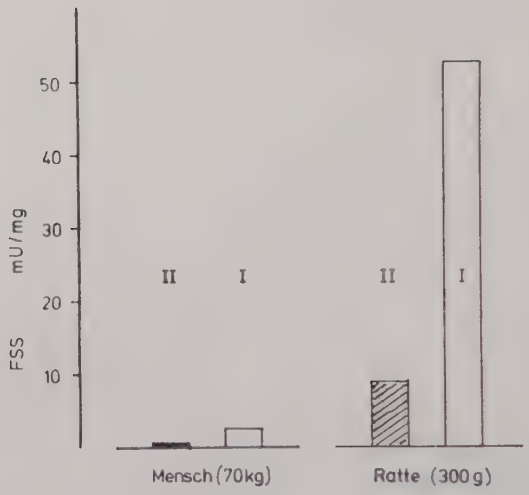

Abb. 20 Spezifische Aktivität der Fettsäuresyntase im sc Fettgewebe einer schlanken Vp und einer Gruppe ausgewogen ernährter Ratten (n = 6).
I = Umstellung auf Kohlenhydratdiät (80 % Kohlenhydrate, 5 % Fette)
II = Ausgewogene Ernährung (43 % Kohlenhydrate, 43 % Fette)

In quantitativer Hinsicht unterscheiden sich die entsprechenden Stoffwechselkapazitäten allerdings beträchtlich. Dies dürfte zum Teil durch die langfristige Anpassung an die jeweils übliche und stark unterschiedliche Nahrungszusammensetzung bedingt sein, da sich durch Angleichung der Fett- und Kohlenhydratzufuhr auch die Unterschiede in der quantitativen Enzymausstattung verringern lassen. Ganz sicher spielen jedoch auch andere, artspezifische Eigenheiten eine Rolle, da in unseren Experimenten mit subkutanen Fettgewebe der Ratte und des Menschen eine völlige Angleichung der Enzymaktivitäten allein durch diätetische Maßnahmen nicht möglich war.

Die Rolle der intraabdominellen Fettgewebe und der Leber wurde in vorliegender Arbeit nur bei der Ratte untersucht und war dort derjenigen des subkutanen Fettgewebes in etwa vergleichbar. Beim Menschen sind derartige Versuche technisch schwer durchführbar und ethisch kaum vertretbar.

Zumindest zeigen die hier beschriebenen Untersuchungen, daß aus Experimenten an fettarm ernährten Ratten keine Rückschlüsse auf die Situation beim ausgewogen ernährten Menschen gezogen werden dürfen.

Eine langfristige ausgewogene Fütterung bei der Laborratte führt zu Lipogenesebedingungen, die sich denjenigen des Menschen annähern. So verbessert dieses Tiermodell die experimentell unbefriedigende Situation wenigstens teilweise.

5. Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war, bei Mensch und Ratte den Einfluß langfristiger Zufuhr von Fetten und Kohlenhydraten auf die Enzymaktivitäten der de-novo Fettsäuresynthese zu untersuchen.

Zur Messung geringer Mengen an ATP-Citratlyase wurde unter Anwendung von Radioisotopen ein empfindliches Testverfahren auf der Basis der Arylaminacetyltransferasereaktion entwickelt.
Die Bestimmungen von Acetyl-CoA und Citrat zeigten die Verwendungsmöglichkeit als Substrattest.
Für die Messung der spezifischen Aktivitäten von ATP-Citratlyase und Fettsäuresyntase in einem gemeinsamen Homogenat wurde der Puffer für den Gewebeaufschluß optimiert.

Die Untersuchungen zur Enzymstabilität ergaben den quantitativen Aktivitätsverlust von ATP-Citratlyase und Fettsäuresyntase bei Einfrieren und Auftauen von Rattengeweben bzw. Homogenaten, sowie bei mehrstündiger Inkubation von Rattenlebergewebe in Pufferlösung bei 25° C.

Mit verschiedenen diätetischen Maßnahmen wurden die spezifischen Aktivitäten von ATP-Citratlyase und Fettsäuresyntase in Leber und drei Fettgeweben der Ratte beeinflußt.

Zweitägiges Hungern senkte die Aktivitäten auf die Hälfte des Ausgangswertes; anschließendes kohlenhydratreiches Wiederauffüttern ließ sie auf ein mehrfaches desselben ansteigen.
Bei einer in Fett und Kohlenhydraten ausgewogenen Fütterung vom Abstillen an wiesen Ratten wesentlich niedrigere Enzymaktivitäten auf, als eine Vergleichsgruppe, die übliches, kohlenhydratreiches Laborfutter erhielt. Diese Un-

terschiede vergrößerten sich mit zunehmendem Körpergewicht. Eine Gruppe von Ratten erhielt bis zu einem Gewicht von 200 g ausgewogene Diät. Bei Umsetzen auf kohlenhydratreiches Futter erreichten die lipogenetischen Enzyme in allen untersuchten Geweben spätestens in vierzehn Tagen Werte, wie in der ausschließlich kohlenhydratreich ernährten Kontrollgruppe.

In den Lebern ausgewogen ernährter, 300 g schwerer Ratten - Tieren mit nur noch geringer lipogenetischer Kapazität - fanden sich Fettsäuresyntase-Aktivitäten, die sich den in menschlichen Geweben gemessenen Werten annäherten.

Bei freiwilligen Versuchspersonen stieg während mehrwöchiger, sehr fettarmer Diät die Aktivität der Fettsäuresyntase im subkutanen Fettgewebe bis zum Vierfachen des jedoch in jedem Fall niedrigen Ausgangswertes an. Die Aktivität der ATP-Citratlyase blieb insgesamt niedrig.

Durch die langfristige, vergleichbare Nahrungszusammensetzung näherten sich die Kapazitäten lipogenetischer Enzyme im Fettgewebe von Mensch und Ratte an. Es blieben aber quantitative Unterschiede bestehen.

In der abschließenden Diskussion wurden Wege und Regulationsmechanismen der Fettsäuresynthese, sowie die Bedeutung der Nahrungszusammensetzung als ein Aspekt für die de-novo Fettsynthese verschiedener Spezies erörtert.

6. Literaturverzeichnis

1 Allmann D.W. and Gibson D.M.: Fatty Acid Synthesis during Early Linoleic Acid Deficiency in the Mouse. J. Lipid Res. 6 (1965) 51-62

2 Allmann D.W., Hubbard D.D. and Gibson D.M.: Fatty Acid Synthesis during Fat free Refeeding of Starved Rats. J. Lipid Res. 6 (1965) 63-74

3 Andres H.: Dissertation, TU München 1982

4 Barth C., Sladek M. and Decker K.: Dietary Changes of Cytoplasmic Acetyl-CoA Synthetase in Different Rat Tissues. Biochem. Biophys. Acta 260 (1972) 1-9

5 Bradford M.M.: A Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein, Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Anal. Biochem. 72 (1976) 248-254

6 Burton D.N., Collins J.M., Kennan A.L. and Porter J.W.: The Effects of Nutritional and Hormonal Factors on the Fatty Acid Synthetase Level of Rat Liver. J. Biol. Chem. 244 (1969) 4510-4516

7 Burton D.N., Collins J.M. and Porter J.W.: Biosynthesis of the Fatty Acid Synthetase by Isolated Rat Liver Cells. J. Biol. Chem. 244 (1969) 1076-1077

8 Burton D.N., Haavik A.G. and Porter J.W.: Comperative Studies of the Rat and Pigeon Liver Fatty Acid Synthetase. Arch. Biochem. Biophys. 126 (1968) 141-154

9 Chesterton C.J., Butterworth P.H., Abramovitz A.S., Jacob E.J. and Porter J.W.: Incorporation of Pantothenate 1-^{14}C into Pigeon Liver Fatty Acid Synthetase: 4'-Phosphopantethein, a Prosthetic Group of the Multienzym Komplex. Arch. Biochem. Biophys. 124 (1968) 386-391

10 Chu Yuan Lin and Soma Kumar: Primer Specifity of Mammary Fatty Acid Synthetase and the Role of the Soluble ß-Oxidative Enzymes. J. Biol. Chem. 246 (1971) 3284-3290

11 Cottam G.L. and Srere P.A.: The Sulfhydryl Groups of the Citrat Cleavage Enzyme. Arch. Biochem. Biophys. 130 (1969) 304-311

12 Craig M.C., Nepokroeff C.M., Lakshmanan M.R. and Porter J.W.: Effect of Dietary Change on the Rates of Synthesis and Degradiation of Rat Liver Fatty Acid Synthetase. Arch. Biochem. Biophys. 152 (1972) 619-630

13 Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V. Frankfurt/Main: Ernährungsbericht 1980

14 Diamant S., Grin E. and Skafrir E.: Enzyme Activities Relatet to Fatty Acid Synthesis in Liver and Adipose Tissue of Rats Treated with Triiodothyromine. Eur. J. Biochem. 26 (1972) 553-559

15 Dipak K. Das: Regulation of Hepatic Fatty Acid Synthesizing Enzymes of Diabetic Animals by Thyroid Hormone. Arch. Biochem. Biophys. 203/1 (1980) 25-36

16 Foster D. and Srere P.: Citrate Cleavage Enzyme and Fatty Acid Synthesis. J. Biol. Chem. 243/8 (1968) 1926-1930

17 Fuchs E.: Dissertation Uni München, in Vorbereitung

18 Gauer O.H., Kramer K. und Jung R.: Physiologie des Menschen, Band II. Urban und Schwarzenberg Verlag München 1971

19 Geigy Tabellen 7. (1975) 197 Thieme Verlag Stuttgart

20 Gibson D.M., Lyons R.T., Scott D.F. and Muto Y.: Synthesis and Degradiation of the Lipogenic Enzymes of Rat Liver. Advanc. Enzyme Regul. 10 (1972) 187-204

21 Glas E.: Dissertation, Uni München 1982

22 Halestrap A.P. and Denton R.M.: Specific Inhibition of Pyruvat Transport in Rat Liver Mitochondria and Human Erythrocytes by Alpha-Cyano-4-Hydroxycinnamate. Biochem. J. 138 (1974) 313-316

23 Hardie G.: Fat and Phosphorylation - the Role of Covalent Enzyme Modification in Lipid Synthesis. TIBS (1981) 75-77

24 Hoffmann G., Weiss L. and Wieland O.H.: Measurement of ATP-Citrate-Lyase and Acetyl-CoA-Synthetase Activity Using Arylamine Acetyltransferase. Anal. Biochem. 84 (1978) 441-448

25 Hoffmann G. and Weiss L.: Transfer of C_2-Units Across the Mitochondrial Membrane. Direct Recording of Citrate, Acetate and Acetoacetate Production Rates. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 359 (1978) 733-740

26 Hoffmann G., Kreisel C., Wieland O.H. and Weiss L.: Pyruvate Dehydrogenase and ATP-Citrate (pro-3-S)-Lyase Activities in Adipose Tissue and Liver of the Young Lean and Older Obese Rat. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 360 (1979) 45-50

27 Hoffmann G.E., Schiessl J. and Weiss L.: ATP-Citrate (pro-3-S)-Lyase in the Rat. Two Step Purification Procedure, Properties, Organ Distribution. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 360 (1979) 1445-1451

28 Hoffmann G.E., Kraupe P., Weiss L. and Wittmann J.: Avian ATP-Citrate (pro-3-S)-Lyase. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 361 (1980) 1117-1119

29 Hoffmann G.E., Kraupe P., Andres H. and Weiss L.: Influences of Age and Obesity on ATP-Citrate (pro-3-S) -Lyase Activities in the Rat. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 361 (1980) 1121-1123

30 Hoffmann G., Andres H., Weiss L., Kreisel C. and Sander K.: Lipogenesis in Man. Properties and Organ Distribution of ATP-Citrate (pro-3-S)-Lyase. Biochem. Biophys. Acta 620 (1980) 151-158

31 Hon Lun Yu and Burton D.: Adaptive Synthesis of Rat Liver Fatty Acid Synthetase: Evidence for in Vitro Formation of Active Enzyme from Inactive Protein Precursors and 4-Phosphopantethein. Bioch. Biophys. Res. Com. 61/2 (1974) 483

32 Hsu R.Y., Wasson G. and Porter J.W.: The Purification and Properties of the Fatty Acid Synthetase of Pigeon Liver. J. Biol. Chem. 240 (1965) 3736-3746

33 Körber E.: Dissertation, Universität München 1982

34 Kornacker M.S. and Lowenstein J.M.: Citrate and the Conversion of Carbohydrate into Fat. The Activities of Citrat-Cleavage Enzyme and Acetate Thiokinase in Livers of Starved and Refeed Rats. Biochem. J. 94 (1965) 209-215

35 Kornacker M.S. and Lowenstein J.M.: Citrate and the Conversion of Carbohydrate into Fat. Activities of Citrate-Cleavage Enzyme and Acetate Thiokinase in Livers of Normal and Diabetic Rats. Biochem. J. 95 (1965) 832-837

36 Kornacker M.S. and Ball E.G.: Citrate-Cleavage Enzyme in Adipose Tissue. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 54 (1965) 899-904

37 Krakower G.R. and Kim K.H.: Purification and Properties of Acetyl-CoA Carboxylase Phophatase. J. Biol. Chem. 256 (1981) 2408-2413

38 Kreisel C.: Dissertation, Universität München 1977

39 Linn T.C., Stark M.J. and Srere P.A.: Coenzym A is Required for Rat Liver Fatty Acid Synthetase Activity. J. Biol. Chem. 255 (1980) 1388-1392

40 Löffler G., Petrides P.E., Weiss L., Harper H.A.: Physiologische Chemie, 168-171 Springer Verlag, 2. Auflage 1979

41 Lornitzo F.A., Katiyar S.S., Puri R.N. and Porter J.W.: Demonstration of the Occurrence of Inactive Fatty Acid Synthetase in Rat Liver by Immunotitration and Its in Vitro Partial Activation. J. Biol. Chem. 256 (1981) 8498-8505

42 Lowenstein J.M.: Effect of (-) Hydroxycitrate on Fatty Acid Synthesis by Rat Liver in Vivo. J. Biol. Chem. 246 (1971) 629-632

43 Lynen F.: Biosynthesis of Saturated Fatty Acids Federation Proc. 20 (1961) 941-951

44 Lynen F.: The Role of Biotin Dependent Carboxylations in Biosynthetic Reactions. Biochem. J. 102 (1967) 381-400

45 Lynen F.: Miami Winter Symposia 1 (1970) 151 North. Holland Publ. Comp. Amsterdam

46 Lynen, Oesterhelt, Schweizer, Willecke: Cellular Compartmentalization and Control of Fatty Acid Metabolism. Universitetsforlaget, Oslo, 1968, 1-24

47 Martin D.B., Horning M.G. and Vagelos P.R.: Fatty Acid Synthesis in Adipose Tissue. Purification and Properties of a Long Chain Fatty Acid-Synthesizing System. J. Biol. Chem. 236 (1961) 663-668

48 Martin B.R. and Denton R.M.: Metabolism of Pyruvate and Malate by Isolated Fat-Cell Mitochondria. Biochem. J. 125 (1971) 105-113

49 Matlib M.A. and O'Brien P.J.: Compartimentation of Enzymes in the Rat Liver Mitochondrial Matrix. Arch. Biochem. Biophys. 167 (1975) 193

50 Nestorescu M.L., Siess F.A. and Wieland O.H.: Ultrastructural Localisation of Pyruvate Dehydrogenase in Rat Heart Muscle. Histochemie 34 (1973) 355

51 Osterlund B., Packer M. and Bridger W.: Characterization of a Stabilizing Factor of Rat Liver and of the Nature of Its Interaction with ATP-Citratlyase. Arch. Biochem. Biophys. 205/2 (1980) 489-498

52 Pugh E.L. and Wakil S.J.: Studies of the Mechanism of Fatty Acid Synthesis. The Prosthetic Group of Acyl Carrier Protein and the Mode of Its Attachment to the Protein. J. Biol. Chem. 240 (1965) 4727-4733

53 Qureshi A., Jenik R., Manok Kim, Lornitzo F. and Porter J.W.: Separation of Two Active Forms (Holo-a and Holo-b) of Pigeon Liver Fatty Acid Synthetase and Their Interconversion by Phosphorylation and Dephosphorylation. Biochem. Biophys. Res. Com. 66/1 (1975) 344-351

54 Rognstad R.: Rate-Limiting Steps in Metabolic Pathways. J. Biol. Chem. 254 (1979) 1875-1878

55 Rognstad R. and Katz J.: Acetyl Group Transfer in Lipogenesis. Fatty Acid Synthesis from Intra- and Extramitochondrial Acetyl-CoA. Arch. Biochem. Biophys. 127 (1968) 437-444

56 Roncari D.A.: Mammalian Fatty Acid Synthetase. Modification of Purified Human Liver Complex Activity. Can J. Biochem. 53 (1975) 135-142

57 Sedgwick B. and Smith S.: The CoA Requirement of Mammalian Fatty Acid Synthetase. Evidence for the Involvment in the Elongation of Acyl-Enzyme Thioester. Arch. Biochem. Biophys. 208 (1981) 365-379

58 Smith S. and Stern A.: Subunit Structure of the Mammalian Fatty Acid Synthetase. Further Evidence for a Homodimer. Arch. Biochem. Biophys. 197 (1979) 379-387

59 Spencer A., Cormann L. and Lowenstein J.M.: Citrate and the Conversion of Carbohydrate into Fat. Comparison of Citrate and Acetate Incorporation into Fatty Acids. Biochem. J. 93 (1964) 378-388

60 Spencer A. and Lowenstein J.M.: The Supply of Precursors for the Synthesis of Fatty Acids. J. Biol. Chem. 237 (1962) 3640-3648

61 Srere P.A. and Bhaduri A.: Incorporation of Radioactive Citrate into Fatty Acids. Biochim. Biophys. Acta 59 (1962) 487-489

62 Srere P.A. and Foster D.: On the Proposed Relation of Citrate Enzymes to Fatty Acid Synthesis and Ketosis in Starvation. Biochem. Biophys. Res. Com. 26/5 (1967) 556-561

63 Suzuki F., Fukunishi K., Daikuhara Y. and Takeda Y.: Studies on Citrate Cleavage Enzyme of Rat Liver. J. Biochem. 62 (1967) 170-178

64 Shiao M.S., Drong R.F. and Porter J.W.: The Purification and Properties of a Protein Kinase and the Partial Purification of a Phosphoprotein Phosphatase That Inactivate and Activate Acetyl-CoA Carboxylase. Biochem. Biophys. Res. Com. 98 (1981) 80-87

65 Shrago E., Lardy H.A. in J. Biol. Chem. 241 (1966) 663-668

66 Shrago E., Glennon J.A. and Gordon E.S.: Comparative Aspects of Lipogenesis in Mammalian Tissues. Metabolism 20 (1971) 54-61

67 Schreiber R.: Persönliche Mitteilung

68 Stoops J.K. and Wakil S.J.: Animal Fatty Acid Synthetase. J. Biol. Chem. 256 (1981) 5128-5133

69 Stoops J.K., Arslanian M.J., Oh Y.H., Aune K.C. and Wakil S.J.: Presence of Two Polypeptide Chains Compricing Fatty Acid Synthetase. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 72 (1975) 1940-1944

70 Titheradge M.A. and Coore H.G.: Initial Rates of Pyruvate Transport in Mitochondria Determined by an "Inhibitor-Stop" Technique. Biochem. J. 150 (1975) 553-556

71 Tweto J., Dehlinger P. and Larrabee A.R.: Relative Turnover Rates of Subunits of Rat Liver Fatty Acid Synthetase. Biochem. Biophys. Res. Com. 48 (1972) 1371-1377

72 Tweto J., Liberati M. and Larrabee A.R.: Protein Turnover and 4-Phosphopantetheine Exchange in Rat Liver Fatty Acid Synthetase. J. Biol. Chem. 246 (1971) 2468-2471

73 Vernon R.G.: Lipid Metabolism in the Adipose Tissue of Ruminant Animals. In: Lipid Metabolism in Ruminant Animals. W.W. Christie, ed., Pergamon Press, New York 1981

74 Volpe J.J. and Vagelos P.R. in Ann. Rev. Biochem. 21 (1973)

75 Volpe J.J. and Vagelos P.R.: Fatty Acid Synthetase of Mammalian Brain, Liver and Adipose Tissue. Regulation by Prosthetic Group Turnover. Biochem. Biophys. Acta 326 (1973) 293-304

76 Watson J.A. and Lowenstein J.M.: Citrat and the Conversion of Carbohydrate into Fat. Fatty Acid Synthesis by a Combination of Cytoplasm and Mitochondria. J. Biol. Chem. 245 (1970) 5993-6002

77 Weiss L., Löffler G. and Wieland O.H.: Regulation by Insulin of Adipose Tissue Pyruvate Dehydrogenase. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 355 (1974) 363-377

Die vorliegende Arbeit wurde von März 1981 bis Januar 1982 im Institut für Klinische Chemie am Krankenhaus München Harlaching (Leiter Prof. Dr. L. Weiss) ausgeführt.

Herr Prof. Dr. L. Weiss stellte das Thema und gab die Anleitung zu dieser Dissertation.

Herr Dr. rer. nat. H. Andres, Herr Dr. med. G. Hoffmann und R. Schreiber unterstützten mich mit wertvollen Ratschlägen und Diskussionen, sowie mit der notwendigen technischen Hilfe.

Herr PD Dr. J. Wittmann (Institut für Physiologie der tierärztlichen Fakultät, Universität München) ermöglichte die Haltung der Versuchstiere, sowie die Herstellung der Versuchstierdiäten.

Die freiwilligen Versuchspersonen nahmen eine mehrwöchige Umstellung ihrer Ernährung in Kauf.

Hiermit danke ich Ihnen allen herzlich für Ihren Anteil am Zustandekommen dieser Arbeit.

LEBENSLAUF:

22. Aug. 1955	geboren in München als erster Sohn von Günter und Franziska Jonas, geb. Neuner
1962 - 1966	Volksschule in München-Waldperlach
1966 - 1975	Asam-Gymnasium, München
Juni 1975	Erwerb der allgemeinen Hochschulreife
Juli 1975 - Sept. 1976	Wehrdienst in Neuburg an der Donau
Januar 1977	Beginn mit dem Studium der Zahnmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München
April 1978	Naturwissenschaftliche Vorprüfung
Oktober 1979	Zahnärztliche Vorprüfung
Juli 1982	Staatsexamen Zahnmedizin
19. Juli 1982	Approbation zum Zahnarzt
Seit Oktober 1982	Assistent in freier Zahnarzt-Praxis